

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EVA PERON

- FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA -

DESECACION POR LIOFILIZACION

por

Alcides A. Thomas

EVA PERON

1952

Tesis presentada por
Alcides A. Thomas para
optar al grado de
Dr. en Bioquímica y Farmacia.

PADRINO DE TESIS

Profesor Dr. Benón Lugones

Señor Decano

Señores Consejeros

Señores Profesores

Cumpliendo con el requisito exigido por nuestra Facultad, elevo a vuestra digna consideración, el presente trabajo de tesis, para optar al grado de Dr. en Bioquímica y Farmacia, que ha sido realizado en la --
Cátedra de Industrias Farmacéuticas.--

Deseo dejar constancia de mi sincero y profundo agradecimiento al Dr. Zenón Lugones, que dirigió esta tesis. Su ayuda constante, y la --
orientación que él supo dar a mi labor, con su experiencia y sus conoci-
mientos, hicieron posible la realización de este trabajo, solucionando
todas las dificultades surgidas durante la realización del mismo.--

Llegue también mi agradecimiento a los Laboratorios "OCEFA", que
gentilmente pusieron a mi disposición algunos materiales y aparatos, uti-
lizados en el curso de mis experiencias; a los doctores Mario Moglia y
Santiago Starita, bajo cuya dirección se realizaron las valoraciones --
biológicas consignadas en este trabajo; al Sr. José Bañez y al Dr. Al-
berto Agosti que realizaron las copias fotográficas que se ilustran en
el mismo; y a todos aquellos que en una u otra forma, prestaron su de--
sinteresada ayuda.--

A MI ESPOSA

A MIS PADRES.

- * DESSECAACION POR LIOFILIZACION *

I - Introducción .-

II - Estudio teórico del método de secado por liofilización.-

a) Congelación inicial.-

b) Eliminación del vapor de agua bajo vacío.-

c) Grado de vacío requerido y temperatura de desecación.-

III- Aparatos de liofilización : descripción general.-

IV - Principales aplicaciones del método de secado por liofilización

V - Estudio experimental:

1. Descripción de los aparatos utilizados.-

2. Experiencias realizadas.-

a) Velocidad de desecación.-

b) Desecación de algunas sustancias biológicas y estudio de las propiedades más importantes de los productos obtenidos.-

Leche de vaca.-

Jugos de naranja.-

Albúmina de huevo.-

Complemento de cobayo.-

Sueros lúcticos.-

Extractos de páncreas.-

Extractos de lóbulo posterior de hipófisis.-

VI - Conclusiones.-

VII- Bibliografía.-

- I - I N T R O D U C C I O N -

I - I N T R O D U C C I O N .-

Se da el nombre de liofilización o secado por sublimación, a una operación en la cual, el agua contenida en una solución, o en un producto cualquiera, previamente congelada, es eliminada en un sistema de alto vacío por sublimación del hielo.-

La liofilización se ha aplicado ampliamente en los últimos años en el secado de plasma y suero sanguíneos para transfusión, conservación de cepas para cultivos bacteriológicos, complemento de cobayo, productos farmacéuticos, como la penicilina y la estreptomicina, alimentos de diversos tipos, como leche, carne, jugos de fruta, etc.-

Dado los excelentes resultados obtenidos, éste método ofrece para el futuro un excelente campo de experimentación para su aplicación en la conservación de sustancias biológicas.-

No obstante ser un método moderno, los principios en que se basa son conocidos desde hace muchos años. Puede decirse que en el año 1909 Shackell L.F.(1) descubrió los principios básicos para la desecación al vacío a partir del estado congelado, ideando un método para la desecación de cantidades relativamente pequeñas de sustancias congeladas. Encontró el problema básico de este tipo de desecación, especialmente cómo tratar el gran volumen de vapor de agua que se pone en libertad a partir de unos pocos gramos de hielo, bajo las condiciones de vacío requeridas para este proceso; volumen muy grande para cualquier bomba de vacío.-

Shackell resolvió este problema por absorción química, usando ácido sulfúrico como agente absorbente, estableciendo así un precedente seguido más tarde por muchos investigadores.-

La concepción de este método abrió camino a una serie de investigaciones prácticas. Shackell lo aplicó en la desecación de carnes y tejidos, e hizo la sugerencia de su aplicación a trabajos de inmunología. Efectuó la desecación de complemento de cobayo, demostrando que permanecía inalterado durante varias semanas. Realizó también una interesante experiencia: sacó sangre a un perro y la recibió en un recipiente con una mezcla congelante, y luego de congelada la desecó; la adición posterior de agua al residuo seco originaba un coágulo de fibrina en pocos minutos, lo cual indicaba que ninguno de los factores que intervienen en el proceso de coagulación habían sido afectados. También probó que el virus de la rabia, fijada en un cerebro de conejo, mantenía su actividad una vez secado. Shackell apreció el valor de su descubrimiento, pero dejó esta clase de investigaciones.-

Simultáneamente por el año 1909, William J. Elser, Ruth A. Thomas y

Gustav I. Steffen (2), se ocupaban del estudio de las reacciones inmuno-lógicas, tratando de buscar una solución al problema de la degradación de los antígenos y anticuerpos, que se presenta cuando se mantienen al estado líquido. Secando estos productos de la manera ordinaria, por el vacío y baja temperatura, mostraban una degradación marcada. Buscando la causa de esa degradación, la atribuyeron a cambios debidos a la asociación de las sales cuando alcanzaban una cierta concentración, desde que los productos secados por el método común no sufrían mayores alteraciones una vez secados. El problema lo resolverían con el descubrimiento de un método de reducción del material al estado seco, que no produjera el aumento de la concentración de las sales durante el proceso, y se les ocurrió que ello podría ser realizado desecando el material en condición congelada. Estos investigadores ^{no} publicaron en ese momento los resultados de sus trabajos, porque consideraron que los principios en que se basaban eran los mismos que los de Shackell (1), y recién en 1935 dieron a conocer los resultados de sus investigaciones.-

Posteriormente, muchos investigadores se dedicaron a la desecación de bacterias en estado congelado. En 1914 Rogers L.A. (3) publicó un trabajo sobre la desecación de bacterias en esa forma; Swift H.F. (4) en 1921 consiguió conservar en buen estado durante algunos años organismos sensibles. En 1929 Sawyer T.A., Lloyd W.D.M. y Kitchen S.F. (5), publicaron un trabajo sobre conservación del virus de la fiebre amarilla.-

Es recién a partir de 1935 que la desecación por el método de liofilización adquiere verdadera importancia, no sólo en la escala de la investigación de laboratorio, sino que a partir de entonces se inicia la producción en escala industrial, de suero humano, plasma y otros productos biológicos.-

En 1935, Elser W.J., Thomas R.A. y Steffen G.I. (2), publicaron el resultado de las investigaciones que habían iniciado en el año 1909. Efectuaron la desecación de productos congelados, ensayando primero, para retener el vapor de agua que se desprende en el transcurso del proceso, P_2O_5 como agente deshidratante, en una tubería especial que se conoce en Estados Unidos con el nombre de "manifold"^(*). Luego introdujeron el uso de superficies muy frías para la condensación del vapor de agua primero usaron colectores enfriados con nieve carbónica a $-70^{\circ}C$ y luego utilizaron condensadores enfriados por refrigeración mecánica con F_{12} a $-34^{\circ}C$. Estos colectores tenían un gran número de conexiones, a las cuales eran unidos los baloncitos que contenían los productos congelados. Aplicando un vacío conveniente en el sistema, resultaba un flu

(*) El término "manifold" se ha traducido como colector.

jo de vapor de agua, desde el material congelado a la tubería de refrigeración, debido a la menor presión de vapor del hielo en la tubería, en comparación con la presión de vapor del hielo en el balón. Estos investigadores fueron los primeros que desecaron grandes cantidades de productos biológicos en los recipientes originales, cerrándolos al vacío al final de la operación. Idearon una cámara para la desecación de materiales en mayores cantidades, y un dispositivo especial para la desecación de microorganismos en pequeños tubitos. De esa manera realizaron la desecación de sueros para fines terapéuticos, antisueros, antígenos, bacterias, fermentos, protozoarios y espiroquetas.-

También en 1935, Flodorf E.W. y Mudd S. (6), emplearon principios similares, utilizando hielo seco con un solvente, "methyl cellosolve"^(o), para el condensador. Aplicaron el procedimiento en la desecación de suero y otras sustancias biológicas.-

Hartley P. (7) en 1936, ha descripto una técnica por medio de la cual son secados sueros estériles en el vacío sobre P₂O₅. Las ampollas con suero eran colocadas en un desecador que contenía P₂O₅, y luego la presión era reducida lentamente. Hartley comprobó que la violenta formación de espuma, que tiene lugar cuando una solución de proteína es llevada a un alto vacío, no era debido a la ebullición de la solución, sino a la liberación de los gases disueltos. Estableció que reduciendo lentamente la presión con la bomba de vacío, podía ser controlada la formación de espuma, consideración muy importante actualmente en los métodos de liofilización, como se verá más adelante.-

Greaves R.I.H. y Adair M.E. (8) aprovecharon esta observación, y aplicaron el método a la desecación de materiales congelados, en recipientes constituidos por ampollas o frascos para vacuna de tamaño adecuado. Los vasos conteniendo la solución de proteína eran colocados primero en un desecador, sin ningún agente desecante, y la presión era reducida a 2 mm. de Hg.- Ocurría entonces la formación de espuma, la cual bajaba cerrando la llave del desecador. Reabriendo y cerrando la llave, después de 15 minutos obtenían un fluido tranquilo en un alto vacío. Después que el contenido de los recipientes congelaba, cerraban la llave del desecador y lo dejaban en un lugar frío durante tres o cuatro días. Al final del proceso dejaban entrar aire seco a través de torres de cloruro de calcio. Los frascos los cerraban con tapones de goma estériles, y atravesando los mismos con una aguja hipodérmica, quitaban el aire por medio de un alto vacío. Luego quitaban las agujas y cubrían los tapones con un baño de cera. Secaron con este método sueros, soluciones de albúminas, complementos de cobayo y cultivo de bac-

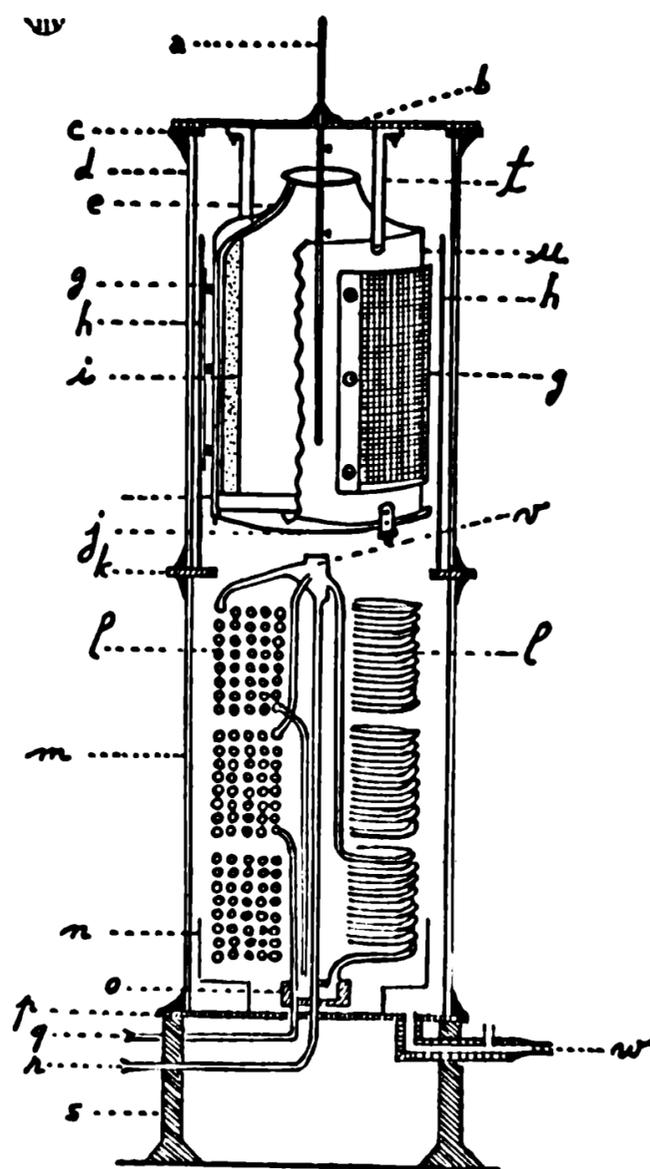
(^o) Mezcla de éter metílico y etilén glicol

terias.-

En 1938 Flosdorf E.W. y Mudd J.(9), comunicaron exitosamente el uso de desecantes químicos en el método denominado: proceso "cryochem". Efectuaron la desecación del material en recipientes de vidrio, que son unidos a un colector, el cual a su vez está en comunicación con una cámara de capacidad variable, en la cual es colocado el agente deshidratante constituido por sulfato de calcio. Esta cámara está conectada con una bomba de vacío, con la cual se consigue reducir la presión en un grado conveniente. La congelación inicial del material la efectúan en bandejas con una mezcla fría, o sino realizan una auto-congelación por medio del vacío (Fotografía n° 3 pág.29). Una vez realizada la desecación, después de hacer entrar aire seco y estéril en los recipientes, estos son re-evacuados y cerrados al vacío. El sulfato de calcio utilizado para absorber el agua es regenerado por el calor, pudiendo ser usado varias veces.-

Un trabajo sobre desecación posterior, fué el de Creaves R.I.N. y Adair M.E.(10). Estos autores emplearon el método de la superficie fría para la condensación del vapor de agua, e hicieron importantes contribuciones al estudio de la termodinámica de la desecación. Construyeron una plata experimental de desecación, para desecar soluciones de proteínas, en volúmenes hasta de cinco litros, distribuidos en un solo frasco o en ampollas, que eran colocados en la sección superior de la cámara, constituida por dos cilindros de vidrio unidos en la parte media. En la parte inferior, la cámara está provista de espirales de refrigeración, que actúan como elementos de condensación. El aparato está provisto de elementos de calefacción para suministrar calor durante la operación. Además, por medio de termocuplas, que actúan en conexión con "relais" termoiónicos, efectúan un control muy seguro del calor entregado al material congelado, lo que les permite saber cuando es alcanzado el punto final de la desecación, y más aún, el porcentaje aproximado de sequedad del material en un momento dado. Según los autores, el control del aparato es tal, que dentro de ciertos límites, las condiciones de desecación pueden ser alteradas a voluntad (Esquema I) y (Fotografía n° 6 pág.35).-

En 1940 Hill J.M. y Pfeifer D.C.(11) hicieron conocer un nuevo proceso para la desecación de suero, plasma y otros productos biológicos: el método "adtevac". Como en otros procedimientos, realizaron la desecación a partir del estado congelado, por medio del vacío y eliminación del vapor de agua, pero la eliminación de éste era realizada en una forma nueva para ese entonces: por adsorción. Utilizaron como -

ESQUEMA I.-APARATO DE GREAVES R.I.N. y ADAIR M.E. (10)

Este esquema muestra los detalles de construcción del aparato de desecación que corresponde a la fotografía nº 6 pág. 35 .-

a) Termómetro termostático. b) Tapa de acero superior. c) Anillo de acero superior. d) cilindro de vidrio superior. e) Botella de 20 litros .
 g) Malla calefactora. h) Pantalla reflectora lustrada. i) Capa de suero congelado. j) Placa de cobre desmontable del fondo del cilindro calefactor. k) Anillo de acero central. l) Espirales de evaporación del condensador. m) Cilindro de vidrio inferior. n) Bandeja de goteo para coleccionar el agua después del deshielo. o) Unión de los tubos de retorno de las espirales del condensador. p) Placa de acero inferior. q) Tubo de retorno al compresor. r) Tubo de entrada de las espirales del condensador. s) Patas de acero atornilladas al suelo. t) Brazos de soporte para el cilindro calefactor. u) Cilindro calefactor de cobre. v) Distribución del gas en tres secciones de las espirales del condensador. -
 w) Unión a la bomba de vacío.-

- - - - -

material de adsorción gel silíceo, por poseer dos importantes cualidades: primero, una gran capacidad de adsorción; y segundo, forma con el agua una unión física, lo que permite eliminarla fácilmente por calentamiento sin ninguna alteración apreciable. Hacen un breve estudio del proceso, físico de la adsorción, e indican que la cantidad de vapor de agua que se adsorbe es una función de la presión del vapor y de la temperatura. A bajas temperaturas, la capacidad de adsorción es aumentada grandemente, hecho que es de gran importancia práctica, dado que cuando el adsorbente retiene el agua es liberada una cantidad definida de calor (calor de adsorción), tendiendo en esa forma a reducir la capacidad de retención del vapor de agua. Eliminan ese calor en el aparato, por un sistema de refrigeración, y en esa forma enfriando el adsorbente le dan mayor capacidad efectiva. Efectuaron principalmente la desecación de plasma, obteniendo un producto de excelente calidad con una humedad residual del 1% o menos. Señalan como principales ventajas, la economía de la operación y el gran margen de seguridad de los productos secados.

Flosdorf E.W., Stokes F.J. y Mudd S. (12), en 1940, dieron a conocer el denominado método "desivac", el cual, según los autores, resulta más económico que los anteriores, sobretodo cuando se trata de secar grandes volúmenes de líquidos, debido a que no utilizan bajas temperaturas de condensación o desecantes químicos para la eliminación del vapor de agua; sino que por medio de un sistema puramente mecánico, lo eliminan del alto vacío hacia la atmósfera, empleando para ello una bomba especial de gran capacidad volumétrica, que se conecta directamente con la cámara que contiene el material congelado a desecar. El agua es eliminada del aceite de la bomba continuamente, manteniendo el aceite a baja presión de vapor; por un dispositivo de centrífuga, es separada de la emulsión aceite-agua, y este aceite clarificado es retornado al lado de alto vacío de la bomba. El sistema es muy eficiente, habiendo obtenido productos con una humedad residual del 1%. Este equipo permite secar de 10 a 100 litros diarios en un aparato simple. (Fotografía n° 7 pág. 38)

En 1941 Boerner F., Flosdorf E.W. y Lukens H. (13) publicaron un trabajo sobre estabilización de complemento de cobayo, al que he de referirme más adelante.-

En 1942 Christensen Royal L. (14) describió un aparato, para uso de laboratorio, de fácil construcción, para la desecación de pequeñas cantidades de productos biológicos a al cual he de referirme después.-

En 1943, Strumia Max M. y Mc Graw J.J. (15), describieron un equipo para la desecación de plasma humano en grandes cantidades. La precongelación la realizan dentro de las mismas botellas, en las cuales ha de d

tribuirse al producto, colocándolas en una cámara de pre congelación que es enfriada por medio del alcohol, que es impulsado al sistema de tubería por un compresor. Por medio de un dispositivo mecánico, las botellas giran y el plasma congela en la superficie de las mismas. (Ver esquema n° 5 pág. 26). El aparato de desecación consta de una cámara, que exteriormente tiene una camisa de agua para elevar o bajar la temperatura; en el interior lleva unos costos especiales para ubicar las botellas con el material a secar y los elementos para el registro de la temperatura. El vapor de agua que se desprende, lo retienen en un condensador enfriado con éter líquido, y el vacío lo realizan con una bomba Cenco He-gavac. Con este equipo secaron plasma humano, suero, cultivos bacteriológicos, leche, jugo de fruta, carnes, etc. con excelente conservación de sus propiedades.-

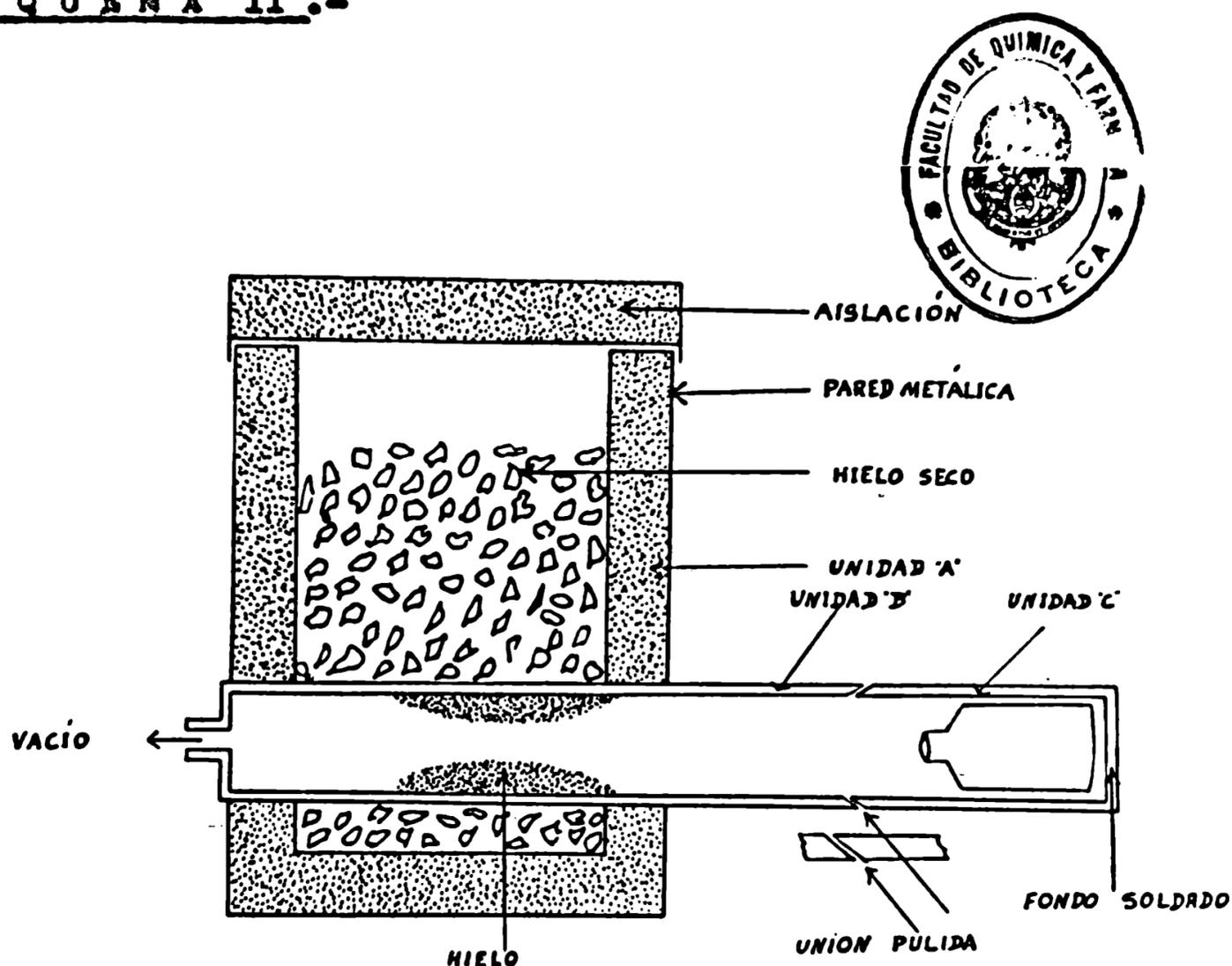
Campbell Danh y Pressman David (16), construyeron en 1944 un aparato de liofilización para trabajos de laboratorio, que permite desecar un volumen de aproximadamente 150 gramos de agua en cinco horas.-

En 1945 Seegers Walter H. (17) hace referencia a un nuevo aparato de liofilización, que permite secar hasta 200 cc. de líquido. Las características del mismo se aprecian en el esquema n° II. (Basado en el mismo hicimos construir uno semejante, al que me referiré en la parte experimental) .-

A partir de 1945 Flosdorf E.W., que es posiblemente quien más ha trabajado en este campo, junto con sus colaboradores ha publicado una serie de trabajos. En uno de ellos, titulado: "Desecación por sublimación" (18), escrito en colaboración con Hull L.V. y Mudd S., se refieren a los principios básicos del proceso de liofilización y a la manera de congelar los productos previo a la desecación; citan las formas de eliminación del vapor de agua con los diferentes métodos utilizables; estudian el grado de vacío y las temperaturas de desecación necesarios; los recipientes apropiados para el secado; para referirse finalmente a las alteraciones que pueden ocurrir en los productos secados durante el proceso o durante su almacenaje.-

En 1945, Flosdorf E.W. (19) en su trabajo titulado "Penicilina desecada por sublimación en Estados Unidos y Canadá", estudia los diversos problemas relacionados con el secado de dicha droga por liofilización.-

Es también en 1945, cuando comienza a aplicarse la liofilización a diversos alimentos en escala tipo industrial. Flosdorf E.W. (20) se refiere a los problemas de los diversos aspectos de esta rama del secado

ESQUEMA II.-APARATO DE SEEGERS WALTER W. (17)

Consta de tres unidades: La unidad A es una caja metálica bien aislada. Está provista de una tapa y va llena de hielo seco para la refrigeración.

Atravesando la caja va un cilindro de paredes metálicas, constituido por dos unidades B y C, que están unidas por una juntura pulida cuidadosamente. La unidad B va dentro de la caja, hace de condensador, mientras que la unidad C contiene el material congelado a ser secado.

Cuando se establece el vacío en el sistema, el agua contenida en el producto sublima y se condensa en la parte fría del tubo que va dentro de la caja.-

por sublimación.-

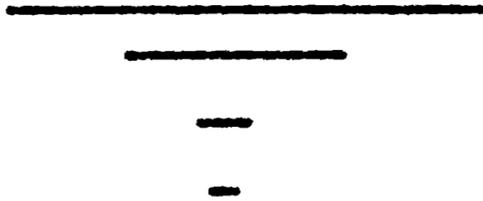
El único trabajo publicado en nuestro país pertenece al Doctor Juan A. Machado (21), quien describió la técnica utilizada para la desecación de sueros, vacunas y otros productos aplicados en la medicina veterinaria, con estudio de la calidad de los productos obtenidos, duración y cambio en las propiedades de sus constituyentes.-

En 1947 Bradish J.C., Brain M.C. y Mc Farlane A.S. (22), describen otro aparato de desecación y hacen importantes consideraciones físi-

cas, necesarias para obtener una velocidad máxima de vaporización compatible con la naturaleza de los productos a secar.--

Entre otros trabajos publicados, merecen citarse uno de Friedgood H.B., Haagen J.A., Garst J.B. y Steinitz L.(23) referente a la concentración de sustancias urinarias por liofilización para el estudio de los esteroides; y otro de Chambers M.A. y Nelson J.W.(24), quienes se han referido últimamente a la conservación de las hojas de belladona por el método de liofilización.--

Quiero terminar la introducción a este tema, señalando que últimamente Flosdorf E.W.(27), ha editado un volumen titulado "Desecación por sublimación", en el cual hace un estudio muy amplio de todos los aspectos concernientes a la desecación de sustancias biológicas por el método de liofilización.--



II - ESTUDIO TEORICO DEL METODO DE SECA-
DO POR LIOFILIZACION. -

II - ESTUDIO TEORICO DEL METODO DE SECA- DO POR LIOFILIZACION .-

El mecanismo del proceso de liofilización comprende el estudio de tres fases fundamentales a saber:

- 1 - Congelación inicial del producto.-
- 2 - Eliminación del vapor de agua bajo vacío .-
- 3 - Grado de vacío requerido y temperatura de desecación.-

1 - CONGELACION INICIAL DEL PRODUCTO

El primer paso, en cualquier procedimiento de liofilización, es congelar el producto o solución a secar.-

Hasta hace algunos años se usaron temperaturas muy bajas para efectuar la congelación, alrededor de -78°C . , que es la temperatura que dá el hielo seco. Actualmente, como la velocidad de congelación, no solamente es función de la temperatura del medio congelante, sino que éste es sólo un factor en la rapidez de la transferencia del calor (18 se ha establecido que es posible congelar a niveles de temperatura -- más económicos , alrededor de -40°C . -

Esta congelación puede realizarse de dos maneras:

a) Precongelamiento externo a bajas temperaturas:

Para operaciones en pequeña escala de laboratorio, puede utilizarse un baño con hielo seco y un disolvente, como acetona, alcohol, kerosene o "methyl cellosolve".-

Como el tiempo necesario para completar la desecación posterior es función entre otros factores, del espesor de la capa de material congelado y de su superficie, conviene efectuar el congelamiento haciendo rotar los recipientes, de modo que el material quede congelado en forma de anillo, alrededor de las paredes del mismo formando una capa delgada.-

Para operaciones en mayor escala, tipo industrial, cuando se trata de pequeños volúmenes como en el caso de productos médicos, por ejemplo, se congela directamente en las cámaras de secado, por descenso de la temperatura de las mismas a alrededor de -40°C . Cuando se trata de volúmenes mayores, como plasma sanguíneo, se usan máquinas especiales en donde se hacen rotar las botellas en un baño a bajas temperaturas. De esa manera se congela en la periferia de los recipientes, lo que permite acortar posteriormente el tiempo de secado (Fotografía n° 1 ,pág.25) .-

b) Autocongelación por evaporación al vacío:

Aquí, el enfriamiento producido por la evaporación al aplicar -- el vacío, produce las bajas temperaturas que originan la congelación.

Es aplicable a productos donde hay poca formación de espuma. Se puede evitar, o disminuir el burbujeo, desgasificando primero lentamente, y luego se produce un vacío más alto para originar la congelación(7)y(8). Este método se aplica especialmente a productos industriales, tales como alimentos.-

Greaves R.I.N.(25), ha descrito otro método para congelar en a-
nillo, por centrifugación, que se conoce con el nombre de "spin free --
zing". Las botellas de 400cc. de suero o plasma, son centrifugadas a --
una velocidad de 900 revoluciones por minuto, en una cámara fría a - -
-18°C. En esta forma el líquido congela en las paredes del recipiente
como pequeños cristales. Greaves dice que este método da al producto -
mayor solubilidad una vez secado.-

2 - ELIMINACION DEL VAPOR DE AGUA BAJO VACIO.-

Una vez que el producto ha sido congelado, el segundo paso es - quitarle el agua congelada por sublimación al vacío.-

Son tres los métodos generales que pueden utilizarse para eliminar el vapor de agua, permitiendo así mantener la baja presión en el sistema:

- a) Condensación a baja temperatura.-
- b) Uso de sustancias desecantes.-
- c) Por bombeo directo del vapor de agua.-

a) Condensación a baja temperatura:

Este método es el que se emplea siempre en los trabajos de laboratorio en pequeña escala. En este caso se utilizan pequeños condensadores, que son enfriados con hielo seco solo, o bien, con hielo seco con algún solvente orgánico, como alcohol, acetona u otro.-

También se aplica ampliamente en la industria, donde se emplean condensadores que son enfriados con hielo seco, o bien con refrigeración mecánica con freon 12, amoníaco, anhídrido sulfuroso o cloruro de metilo. El hielo seco fué utilizado en los condensadores desde el principio, cuando se comenzó a ensayar la liofilización en escala industrial. En 1935, Elser W.J., Thomas R.A. y Steffen G.I. (2), quienes utilizaron primeramente un desecante químico, P_2O_5 , lo reemplazaron después por nieve carbónica. Posteriormente, los mismos investigadores comprendieron que resultaba más ventajosa la refrigeración mecánica y la utilizaron en sus aparatos, que fueron provistos con tubos donde circulaba freon 12. Actualmente, se prefiere no utilizar la nieve carbónica en los aparatos industriales, debido a su mayor costo, - salvo en aquellos casos donde sea necesario y siempre que el alto valor de los productos a secar lo justifiquen.-

Los condensadores con medios refrigerantes fueron aplicados por primera vez en la liofilización en 1935(2). En 1939 Greaves R.I.N. y Adair M.E. (10) usaron condensadores enfriados con cloruro de metilo y anhídrido sulfuroso (ver esquema I, pág. 5 y fotografía n°6 pág. 5)

Strumia H. y Mc Graw L. (15) utilizaron freon 12. Estos condensadores refrigerados mecánicamente con medios refrigerantes, son los que más se prefieren en la escala industrial debido a su mayor economía.-

Temperatura de los condensadores :

Con respecto a la temperatura que ha de usarse en el condensador, voy a enumerar una serie de consideraciones citadas por Flosdorf E.W. (18), que dice lo siguiente:

"La apropiada temperatura requerida para la superficie de condensación, depende del coeficiente de transmisión del calor a la superficie fría, lo cual está influenciado por los siguientes factores":

A) Por la naturaleza de la superficie del condensador: dice al respecto que una superficie metálica es mejor conductora que el vidrio o el hielo, por lo cual ha de preferirse.-

B) Por el área de la superficie de condensación: establece que debe ser grande, para mantener en un mínimo la cantidad de calor a ser transferida por unidad de área. Cuando menor es la cantidad de calor a ser transmitida por unidad de área, menor es la diferencia total requerida entre la temperatura del refrigerante y la temperatura correspondiente a la presión de vapor de agua en el sistema.-

D) Por los gases no condensables que contaminan el vapor de agua: estos influyen en la diferencia entre la presión de vapor del hielo en el sistema, y la presión de vapor correspondiente a la temperatura de la superficie del hielo en el condensador. Este factor se controla usando equipos de alto vacío con bombas de adecuada capacidad.-

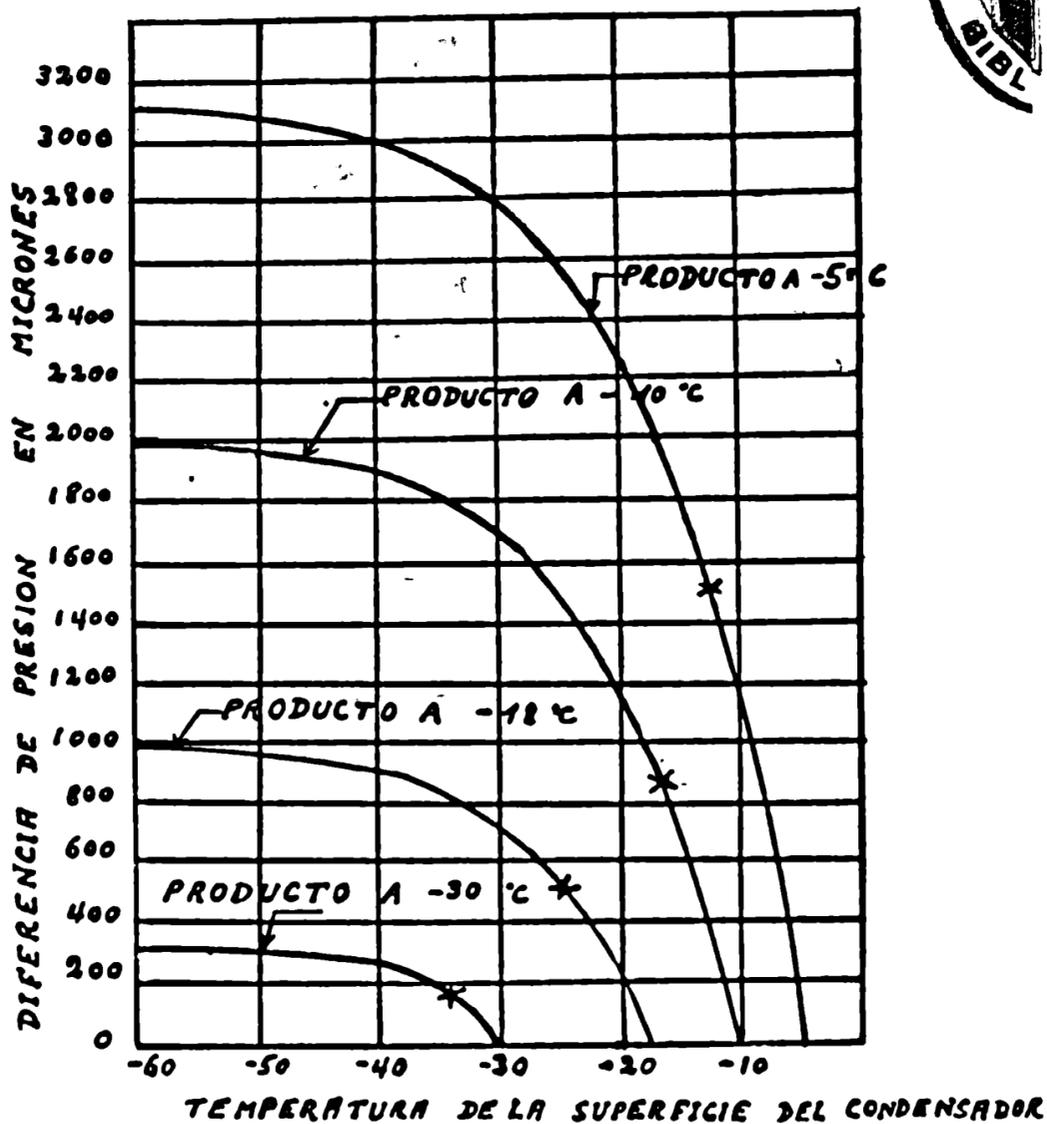
Dice Flosdorf E.W. (18), que para acelerar la transferencia del calor, se propusieron superficies metálicas de pequeña área continuamente desheladas, para obtener una superficie metálica en el condensador, libre de la capa de hielo de poca conductibilidad. Pero en la práctica, no se consigue una superficie bien limpia, porque se forma una película molecular de hielo que es también mala conductora. Además, se requiere un cierre hermético para las partes móviles (paletas raspadoras) y por lo mismo una mayor capacidad en la bomba. Por consiguiente, en estos condensadores de superficie reducida, deben ser mantenidas temperaturas más bajas, lo cual no compensa la economía que se puede ganar en otra forma.-

El uso de superficies fijas de mayor área, es más simple y da mejores resultados. En los condensadores con superficie grande, el calor a ser transmitido por unidad de área es pequeño, y ellos mantienen por sí mismos una delgada capa de hielo, de modo que ambos efectos conducen a una temperatura más alta del condensador.-

Después de estas consideraciones, Flosdorf E.W., considera que el resultado de estos cuatro factores enumerados, en conjunto determinan la presión efectiva del vapor de agua, que puede ser establecida dentro del sistema de vacío por el condensador durante la desecación. La diferencia entre esta presión y la presión del vapor del hielo del producto que se seca (plasma, medicamentos, etc.), determina la velocidad teórica máxima del secado. De acuerdo con esto, la presión de vapor --

del producto, a la temperatura a la cual debe ser secado, determina la temperatura a la cual debe ser mantenido el condensador, lo que depende por lo tanto de la naturaleza del producto. En el gráfico N^o III (- que pertenece a Flosdorff B.W.-18-), se muestra la diferencia de presión producida por varias temperaturas de la superficie de condensación, en relación a cuatro diferentes temperaturas a las cuales los productos deben ser mantenidos. Establece que para cada uno de los productos que se seca hay una temperatura mínima de la superficie de condensación, debajo de la cual se gana muy poco incremento en la diferencia de presión, por una reducción posterior en la temperatura del condensador.-

ESQUEMA III .-



---Fuerza directriz, expresada en diferencias de presión, producidas por varias temperaturas del condensador, para productos que se mantienen a tres diferentes temperaturas. La cruz en cada curva, representa la temperatura de la superficie del condensador, que origina la máxima diferencia para cualquier valor de acuerdo a la ecuación de Napier, no originándose ningún orificio restrictivo en las tuberías y partes semejantes, excepto en los intersticios de la capa exterior del producto seco. Esto se aplica en el primer tiempo del secado cuando está sublimando el hielo.-

Esto ya había sido estudiado por Greaves R.I.N. (10), quien estableció por ejemplo, que secando suero a -35°C ., estando el condensador a -45°C ., hay una diferencia de presión de 0,111 mm. de Hg. - Si se reduce la temperatura del condensador a la del aire líquido, -184°C ., la misma diferencia de presión baja la temperatura del suero a $-39,5^{\circ}\text{C}$., o sea sólo en $4,5^{\circ}\text{C}$. -

Según Flosdorf E.W. (18), ello sería debido a lo siguiente: a medida que avanza la desecación, la velocidad de ésta disminuye, porque el vapor debe difundir a través de los intersticios de la capa externa del producto secado poroso, los que actúan como verdaderos orificios.- Dice entonces, que se puede aplicar la ley del flujo adiabático de los gases a través de orificios (Ecuación de Napier), según la cual, una diferencia de presión de vapor entre la superficie del hielo en el condensador y aquella de la superficie del hielo dentro del producto - que se seca, donde la primera es el 55% de la última, resultaría en la velocidad máxima del flujo de vapor obtenible.-

En otras palabras, mas allá de un cierto límite, la disminución de la temperatura del condensador no puede compensar las restricciones citadas. Por ejemplo: trabajando con plasma a -21°C ., una temperatura del condensador del -27°C . produce una presión de vapor igual a 55% de la presión del plasma, y temperaturas más bajas del condensador no aportan ningún beneficio.-

Esto nos indica que no es necesario utilizar en el condensador temperaturas tan bajas como -78°C .- En la mayoría de los casos es suficiente una temperatura entre -30°C . y -40°C . -

b) Uso de sustancias desecantes:

Este procedimiento es antiguo, ya que fué utilizado en 1909 por Shackell L.F. (1), quien empleó ácido sulfúrico para retener el vapor de agua en sus experiencias.-

A partir de 1935 se generalizó su uso en la liofilización, y muchos son los investigadores que las han usado.-

Se usó primeramente el pentóxido de fósforo: Elser W.J., Thomas R.A. y Steffen G.I. (2); Hartley P. (7); y Greaves R.I.N. y Adair M.E. (8) lo emplearon en sus experiencias. Debido a su costo, y a que se encontraron desecantes más apropiados, el P_2O_5 dejó de usarse.-

En efecto: más tarde se introdujeron desecantes regenerables. Estos tienen la ventaja que una vez usados, se elimina el agua por calentamiento y pueden así ser utilizados de nuevo. Estos desecantes son de dos tipos: unos forman con el agua hidratos químicos; tal es el caso del sulfato de calcio, que fué utilizado por Flosdorf E.W. (9) en el -

proceso "aryochem". Los otros fijan el agua por adsorción, como ocurre con el gel silícico. A medida que se produce el secado, como resultado de la reacción del vapor de agua con el agente químico, se produce una cierta cantidad de calor (calor de reacción) al mismo tiempo que el desecante se va saturando y por lo tanto disminuyendo su capacidad (9). Debido a ello, para mantener una presión efectiva del vapor del desecante, es necesario eliminar ese calor, lo que se consigue por refrigeración; y además controlar la cantidad de desecante y cambiarlo por una nueva tanda cuando sea necesario.-

Hill J.M. y Pfeiffer D.C. (11) utilizaron gel silícico, en un aparato con un sistema de refrigeración mecánica para eliminar el calor. El gel silícico tiene la ventaja de que permite adsorber el alcohol y otros solventes orgánicos de las soluciones que se están secando.-

También se han ensayado el cloruro de calcio, los percloratos de magnesio y de bario, pero éstos son más caros y difíciles de regenerar

De manera que las sustancias más convenientes para éste método, serían el sulfato de calcio y el gel silícico.-

c) Eliminación del vapor de agua por bombeo directo:

Este método fue introducido por Flodorf E.W., Stokes F.J. y Mudd S. (12) en 1940, cuando dieron a conocer el proceso denominado "de sivac" .-

El vapor de agua es eliminado directamente del sistema por medio de las bombas, sin necesidad de condensadores ni agentes químicos.-

Se usan para ello bombas rotatorias de aceite, las cuales están provistas con dispositivos especiales (clarificadores centrífugos). En efecto, por un dispositivo de centrífuga, el agua es eliminada de la emulsión aceite-agua, y ese aceite clarificado es retornado al lado de alto vacío de la bomba. Dichas bombas por lo general son de gran capacidad, por lo cual el método resulta muy eficiente.- (Fotografía n° 7 pág. 38).-

Para operaciones en gran escala, cuando es necesario eliminar el vapor de agua de cámaras de secado de capacidad grande, se prefieren los eyectores de vapor con condensadores intercalados.- (Fotografía n° 8 pág. 39).-

También pueden usarse combinaciones de eyectores de vapor con bombas de difusión de aceite.-

Según Flodorf E.W., Stokes F.J. y Mudd S. (12), con este sistema se puede operar a una presión inicial de 4,5mm. de Hg. manteniéndose los materiales congelados sin peligro de deshielos, y al final del ciclo de secado puede operarse debajo de los 200 micrones, lo que permite obtener una humedad residual del 1% .-

3-GRADO DE VACÍO REQUERIDO Y TEMPERATURA DE DESSECACIÓN.-

Para que el vapor de agua que sublima del producto congelado, pueda eliminarse hacia el condensador, es necesario mantener un grado de vacío conveniente en el sistema, que a su vez es primordial para evitar que ocurra el deshielo de los productos que se están secando.-

Según Floedorf E.W. (27), en el secado por sublimación pueden distinguirse dos períodos:

Primer período:

En este primer tiempo el hielo es evaporado a partir de una masa helada del producto congelado; es la etapa en la cual se elimina el 98 a 99% del agua. Las temperaturas están siempre debajo de 0°C., dependiendo lógicamente de la naturaleza del producto.-

Señala, que son pocos los productos que pueden ser secados a una temperatura mayor de -5°C. en esta primera etapa. Los alimentos y algunos productos médicos pueden ser secados entre -5°C. y -10°C. La penicilina, cuando se trata de mezclas impuras, requiere -40°C.; la estreptomycinina -30°C.; los virus temperaturas debajo de -20°C.-

En cuanto a la presión, o grado de vacío, está también de acuerdo con la naturaleza del producto, ya que ella a su vez depende de la temperatura a la cual está siendo secado, siempre que se use una bomba de vacío eficiente y no haya entrada de aire en el sistema. Por ejemplo, cuando se seca plasma, la presión puede ser de 500 a 800 micrones, en algunos productos como suero, puede ser hasta 2000 a 3000 micrones. En cambio, cuando se seca penicilina debe ser de 200 a 300 micrones.-

Floedorf E.W. (18) dice también, que un factor importante es que muchas veces, aún secando debajo de 1°C., ocurre una separación eutéctica, o sea de una parte de solución concentrada, y se origina una aparente ablandamiento parcial. Esto, que en realidad es aparente, porque el producto permanece duro y quebradizo, dice que debe ser evitado usando temperaturas más bajas. De ahí, por ejemplo, que para secar suero se necesita una temperatura de -9°C. a -12°C.; en cambio para plasma son necesarios -20°C. a -25°C.. De acuerdo a la presión de vapor del hielo que corresponde a estas dos temperaturas, es posible usar una presión tres veces más alta en la dessecación de suero que en la de plasma, como se ve en la tabla siguiente, perteneciente a Floedorf E.W. (27)

- Temperatura y presiones de desecación -

Producto	Temperatura de desecación en grados C°	Presión de vapor (mm. Hg.)	Promedio de presión de vapor
Suero	-9° a -12°	1,8 a 2,3	2,05
Plasma	-20° a -25°	0,5 a 0,8	0,65
Penicilina	-28° a -32°	0,2 a 0,3	0,25

Flosdorf E.W., señala que Greaves R.I.K. (26) sugirió la determinación del punto eutéctico de las soluciones, para determinar la temperatura a la cual deben ser mantenidas durante la liofilización. De su experiencias sacó las siguientes conclusiones: el suero debe ser mantenido debajo de -10°C. en el primer estado de la desecación; el plasma entre -10 y -25°C. dependiendo de la cantidad de citrato y de proteínas; la penicilina debajo de -25°C. si es solución impura (soluciones puras — pueden secarse a temperaturas más altas); las muestras de caldos de cultivos para virus y bacterias a -30°C., aunque en algunos casos son necesarios -60°C., para tener una desecación perfecta.-

Segundo período:

Durante éste período es eliminada la pequeña cantidad de agua que queda en el producto casi seco, para llevar la humedad residual a un mínimo, a un 0,50% o menos. Aquí, el producto casi seco se somete a una temperatura tan alta como sea posible, para obtener el mínimo de humedad en el menor tiempo posible. Dicha temperatura dependerá entonces de la naturaleza del producto: las bacterias y los virus no pueden ser calentados a temperaturas mayores que la temperatura ambiente; el plasma en cambio, puede resistir hasta 80°C.-

En éste segundo período, debe proveerse, sea con la bomba de vacío y condensador, o con la bomba de vacío y agentes químicos, una presión de vapor más baja que la presión de vapor del producto, para obtener un bajo contenido residual de humedad. Generalmente, una presión menor de 200 micrones (100 micrones), y una temperatura del condensador de -40°C. son adecuados.-

El plasma y el suero pueden calentarse a 80°C.; en cambio las bacterias y virus, los jugos de frutas, la leche, y otros productos no resisten esa temperatura.-

Para productos higroscópicos, que no son estables a temperaturas altas, se puede recurrir a desecantes químicos, como el sulfato de calcio (9) o el gel silícico (11), con los cuales se pueden conseguir presiones inferiores a 100 micrones, en combinación con una buena bomba —

de vacío.-

Hay que hacer notar que la temperatura del producto que se está secando, en cualquiera de los dos períodos, está influenciada por el grado de obstrucción del flujo de vapor de agua al condensador (10). Cuanto mayor sea la obstrucción, mayor será la temperatura del producto. La obstrucción excesiva causada por un vacío pobre, o debida a pérdidas en el sistema, o a bombas de vacío deficientes, tubos de diámetro angosto, ampollas de cuello delgado, o colectores con tubos largos y delgados, pueden conducir a una elevación de temperatura tan seria, que provoquen el derretimiento del producto congelado.-

Calentamiento del producto y velocidad de desecación .-

Para mantener una temperatura debajo de la temperatura de congelación, es necesario efectuar un balance entre el suministro de calor y la pérdida de calor por evaporación, controlando la relación entre la superficie de evaporación y la superficie del producto congelado (27)

Por lo tanto, debe tenerse en cuenta el tamaño y la forma del recipiente que se utilice, la cantidad de producto congelado y la posición y la forma como se congela el producto.-

El calor se suministra en la superficie del producto congelado adyacente a la pared exterior del recipiente, y se utiliza en la superficie de evaporación.- Lógicamente, cuanto más rápido pueda ser suministrado el calor, más rápidamente se realizará la desecación, pero la temperatura del producto no debe elevarse nunca más arriba de su punto de licuación.-

Flosdorf E.W. (27) cita al respecto a Greaves R.I.N. (26), quien indica que el suministro del calor latente de sublimación, es el factor más importante de la desecación por liofilización. Aplica la ecuación de Clayperón para calcular el calor de evaporación del hielo a diferentes temperaturas:

$$\frac{d P}{d T} = \frac{\alpha}{T} (v_2 - v_1)$$

Establece que de acuerdo a esta ecuación, la velocidad de desecación depende solamente de la velocidad de aplicación del calor, la cual a su vez depende de:

- a) del rendimiento del refrigerador.-
- b) de la más alta temperatura a la cual puede ser secado el producto, la cual a su vez depende del grado de obstrucción del flujo de vapor y de la temperatura del condensador.-
- c) de la velocidad de transmisión del calor a través del material congelado.-

Por consiguiente, si la potencia de calor es muy alta, se produ-

cirá el deshielo en el punto de contacto del material con la superficie de calentamiento.-

Greaves R.I.N.(26) sacó el siguiente valor útil: 1 Watt de potencia de calor secará 1 ml. en una hora.-

Establece que el calor aplicado al material congelado, produce una diferencia de presión de vapor entre la superficie evaporante y la de condensación, y esto ocasiona una diferencia de temperatura entre las dos superficies; y por consiguiente en el sistema habrá: una diferencia de presión; una obstrucción; y una velocidad de flujo, cuya relación es la de la Ley de Chm:

$$\frac{\text{Diferencia de P. de vapor}}{\text{Obstrucción de flujo}} = \text{Velocidad de flujo}$$

Y hace el siguiente razonamiento: como la velocidad de flujo depende de la potencia de calor en watts, tenemos:

$$\frac{\text{Diferencia de presión de vapor}}{\text{Obstrucción de flujo}} = K \times \text{Watts}$$

Greaves R.I.N.(26), define como unidad obstructiva de resistencia, aquella que bajo una diferencia de presión de vapor de 0,01 mm.de Hg., - pasa el vapor a la velocidad a la cual es liberado por una potencia de calor de 1 Watt.

$$\text{Luego: } \frac{P}{R} = \frac{W}{100}$$

P:presión de vapor en mm. de Hg.

R:obstrucción expresada en las unidades propuestas

W:potencia de calor en watts

Haciendo R infinitamente pequeña, W puede ser infinitamente grande, sin gran elevación de P ; pero un valor infinitamente grande de W - causaría una alta temperatura y la fundición del material congelado en la superficie de contacto.-

De acuerdo con la fórmula anterior, la desecación en recipientes abiertos (platos), será más rápida que la efectuada en botellas abiertas o con tapas filtrables.-

Floodorf E.W.(27) dice sin embargo, que usando botellas de un orificio apropiado, no hay una diferencia tan amplia en la desecación como la que indica Greaves R.I.N. .-

Velocidad de desecación: La velocidad de desecación varía con la naturaleza de los productos que se secan, y de acuerdo con una serie de factores. De aquí que no es posible trazar curvas de desecación que se apliquen igualmente a cualquier clase de producto.-

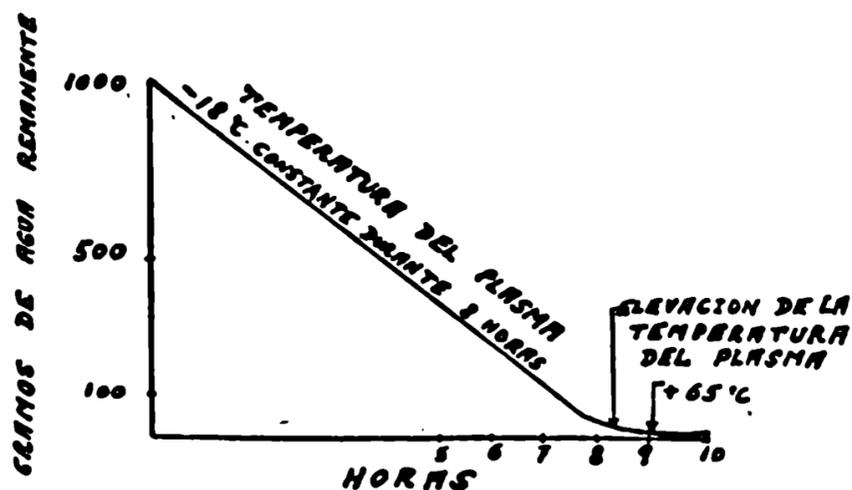
La velocidad de desecación varía en primer lugar , con la forma - que es congelado el producto: por ejemplo, cuando se congela el plasma

en forma de anillo dentro de una botella, a medida que la desecación prosigue, la capa de hielo retrocede, y va aumentando el área de evaporación; en consecuencia tiene lugar una continua aceleración de la velocidad de desecación hasta que el hielo ha desaparecido. En cambio, en el caso de que el producto se congele pulverizado en una superficie, ocurre la inversa: la velocidad de desecación es más rápida inicialmente porque el área de evaporación es mayor.-

Flosdorf E.W. (27), establece que considerando condiciones uniformes, tales como la desecación de líquidos congelados a granel en recipientes planos, como bandejas, o en el fondo de las botellas en forma de taco, es posible calcular una velocidad de desecación. Establece que ésta es alrededor de 1 mm. de profundidad por hora, trabajando en condiciones óptimas de presión de vapor y con medios eficientes de calentamiento.-

Según Flosdorf E.W. (27), para la mayoría de las sustancias: en el 80% del tiempo de desecación, se elimina el 95% del peso total del agua. Al final del 90% del tiempo total de desecación, la humedad final es del 1%. En el 10% final del tiempo, se lleva el contenido final de humedad debajo del 0,5%. Esto se aprecia en el Esquema IV.-

ESQUEMA IV.-



VELOCIDAD DE DESECACION DE UNA SOLUCION DE
PROTEINAS DEL PLASMA AL 10 % CONGELADA EN
UNA CAPA PLANA UNIFORME DE 10 mm. DE ESPESOR

----- (De Flosdorf E.W. -27 -)

La velocidad de desecación varía lógicamente con la máxima tempe

ratura permitible para cualquier producto.-

También tiene su influencia la concentración inicial de las soluciones, y la naturaleza de los productos. Con concentraciones iniciales mayores del 10%, se retarda la eliminación de la humedad residual. También se retarda, cuando el material no tiene al final una estructura completamente porosa; tal es el caso del jugo de naranja concentrado, que para bajar la humedad final del 1% al 0,1%, se requiere 20% del tiempo total de desecación.-

En conclusión, se puede decir que para cualquier material dado, es necesario determinar experimentalmente la velocidad a la cual puede ser realizada la desecación.-

En términos generales, según Flosdorf E.W. se calcula que en capas de un espesor de pocos mm. hasta 30 mm., a una temperatura de -10°C a -20°C. la velocidad de desecación sería alrededor de 1 mm. de profundidad por hora. En capas más delgadas, la velocidad puede ser doble o triple. En otros productos, como soluciones concentradas de aminoácidos, dice que puede ser tan pequeña como 0,2 mm. de profundidad por hora.-

Bradish J.C., Brain M.C. y McFarlane A.S. (22), creen que la velocidad de desecación está controlada por las limitaciones en la velocidad de transferencia del vapor de agua del producto congelado hacia el condensador. Por ello establecen, que para ^{que} la sublimación del hielo tenga una velocidad máxima por unidad de área de producto expuesto, a una temperatura especificada, deben satisfacer las siguientes condiciones:

- 1 - La presión del vapor del hielo sublimado en el condensador, será despreciable comparada con la del hielo a la temperatura del producto
- 2 - La superficie de condensación y del producto tendrán una separación uniforme y mínima.-
- 3 - La presión permanente del gas (generalmente aire) en el inter-espacio producto-condensador, debe ser mínima.-
- 4 - Las obstrucciones mecánicas para la transferencia del vapor del producto al condensador deben ser mínimas.-
- 5 - El producto debe ser de un espesor uniforme y mínimo. "

Establecen que puede demostrarse, que la velocidad máxima de evaporización de una superficie de hielo en un vacío perfecto, está dada por la ecuación:

$$G \text{ máx.} = 0,244 \frac{\alpha P_s}{\sqrt{T}} \text{ (gr. por cm}^2 \text{ por segundo)}$$

P_s , es la presión de vapor saturado en mm. de mercurio, en la superficie del hielo a la temperatura absoluta T .

0,244 es una constante numérica, que es función del peso molecular

del material que se vaporiza.-

α es el coeficiente de condensación; expresa la fracción de moléculas de vapor de agua que entra en la masa de hielo del condensador, - haciendo colisión en su superficie.-

Citan a Tschudin K.(28), quien ha encontrado para valores de T entre -60°C . y -86°C ., un valor de α igual a $0,94 \pm 0,06$. -

Según estos autores, cada molécula cuando abandona la superficie de evaporación, sufrirá colisiones con el material parcialmente seco, y en el interespacio que debe recorrer, para ir a condensarse en la superficie del hielo del condensador. Luego, la velocidad de sublimación vendrá dada por la masa del vapor de agua transferida en la unidad de tiempo, del material congelado al condensador.-

Debido a ello, los sistemas de desecación en los cuales la superficie de evaporación y condensación están ampliamente separados, o en los cuales la presión permanente del gas es alta, la velocidad de sublimación es baja, debido a los numerosos choques moleculares.-

Bradish J.C., Brain M.C. y Mc Farlane A.S.(22), dicen que han obtenido velocidades de desecación más rápidas, lo que atribuyen al equipo utilizado, consistente en una bandeja de evaporación y a un condensador plano situado a 6 cm. arriba del plano de la bandeja, que reúne todos los requisitos anteriormente enumerados. El plano de superficie del hielo retrocede 1,5mm. por hora, lo que les da una velocidad de vaporización de 34 microgramos por cm^2 por segundo.-

Flosdorf E.W.(27), analiza las consideraciones de Bradish y sus colaboradores, y dice que no hay evidencia de que la velocidad de desecación más rápida, no sea debida a una mejor transferencia de calor a la superficie de evaporación del hielo. Para Flosdorf, la velocidad de desecación depende de la velocidad con que el calor puede ser llevado a la superficie de evaporación.-

III - APARATOS DE LIOPILIZACION

- DESCRIPCION GENERAL

III - APARATOS DE LIOFILIZACION :

DESCRIPCION GENERAL

De acuerdo con las consideraciones enumeradas en el capítulo anterior, el equipo utilizado en el método de liofilización, comprende el estudio de los siguientes aparatos:

- 1 - Aparatos para el congelamiento inicial del producto.-
- 2 - Cámaras de desecación y colectores para la unión de los recipientes.
- 3 - Condensadores para la retención del vapor de agua. Utilización de agentes químicos. Equipos para bombeo directo del vapor de agua.-
- 4 - Equipos para la producción y medida del vacío.-

1 -

1 - APARATOS PARA EL CONGELAMIENTO INICIAL DEL PRODUCTO:

Hemos visto que la congelación inicial del producto o solución a secar, podía realizarse de dos maneras: por precongelmiento externo a bajas temperaturas y por autocongelación por evaporación al vacío.-

Con respecto a la forma como ha de congelarse el producto en los recipientes, Flosdorf E.W. (27) cita cuatro variantes:

a) Congelamiento plano, que es el congelamiento efectuado colocando las botellas de costado;

b) Congelamiento inclinado, cuando la botella se eleva del cuello, para evitar que el líquido salga del recipiente antes que termine la congelación;

c) Congelamiento en taco, cuando se congela el material en el fondo del recipiente, estando éste en posición vertical;

d) Congelamiento en anillo (o shell freezing) que es la congelación efectuada en la periferia de los recipientes, en forma de capa delgada, haciendo girar los mismos en el baño congelante. Este procedimiento es necesario cuando se desecan volúmenes grandes, como en el caso del plasma sanguíneo en que las botellas se cargan con cantidades de 300cm³ aproximadamente. Los recipientes se hacen girar en un baño helado, de modo que el material congela en forma de un anillo o banda en la periferia interna de los mismos. Esto tiene la ventaja de que se obtiene una mayor superficie de evaporación, lo que acelera el secado. Además, la solubilidad de los productos secados en esta forma es mayor, debido a la mayor superficie, lo que significa una ventaja para productos poco solubles, como globulinas concentradas.-

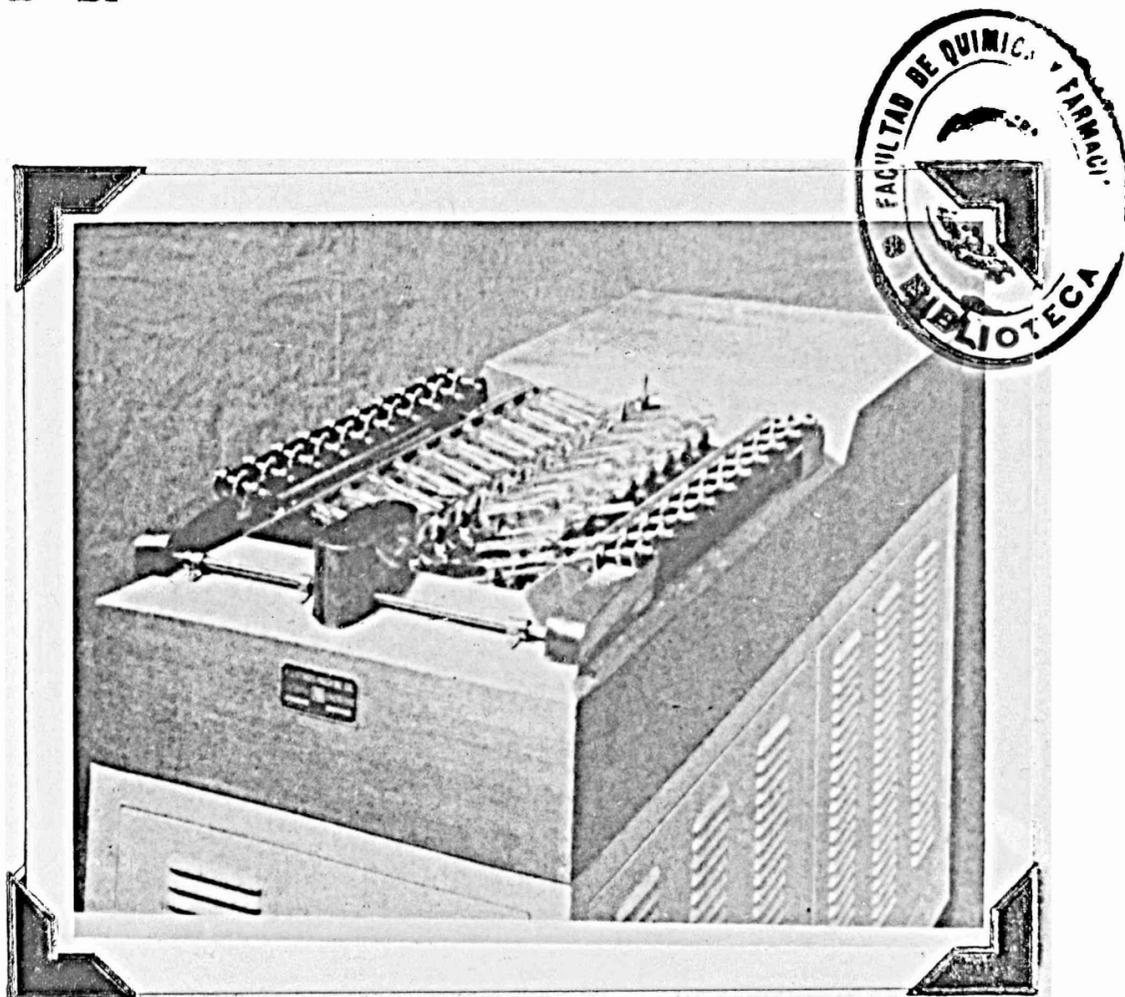
La congelación en pequeña escala, se realiza colocando los recipientes o ampollas en un baño helado, con nieve carbónica y un solvente or -

gánico, como acetona, alcohol, kerosene u otros, con los que se obtienen temperaturas inferiores a -50°C . Si se quiere congelar en anillo, habrá que hacer girar los recipientes mientras se congela.-

Las temperaturas que pueden obtenerse con mezclas de algunas de estas sustancias y nieve carbónica son las siguientes:

Alcohol y nieve carbónica	: -72°C .-
Cloroformo y nieve carbónica	: -77°C .-
Eter y nieve carbónica	: -77°C .-
Acetona y nieve carbónica	: $-56,7^{\circ}\text{C}$.-

Se han ideado máquinas especiales, para trabajos en gran escala, en las cuales las botellas se hacen girar mecánicamente en un baño en frío con algún refrigerante como freon 12, alcohol, amoníaco, u otros. Flodorf E.W. (18), describe una máquina de éste tipo que se ilustra en la fotografía nº 1.-



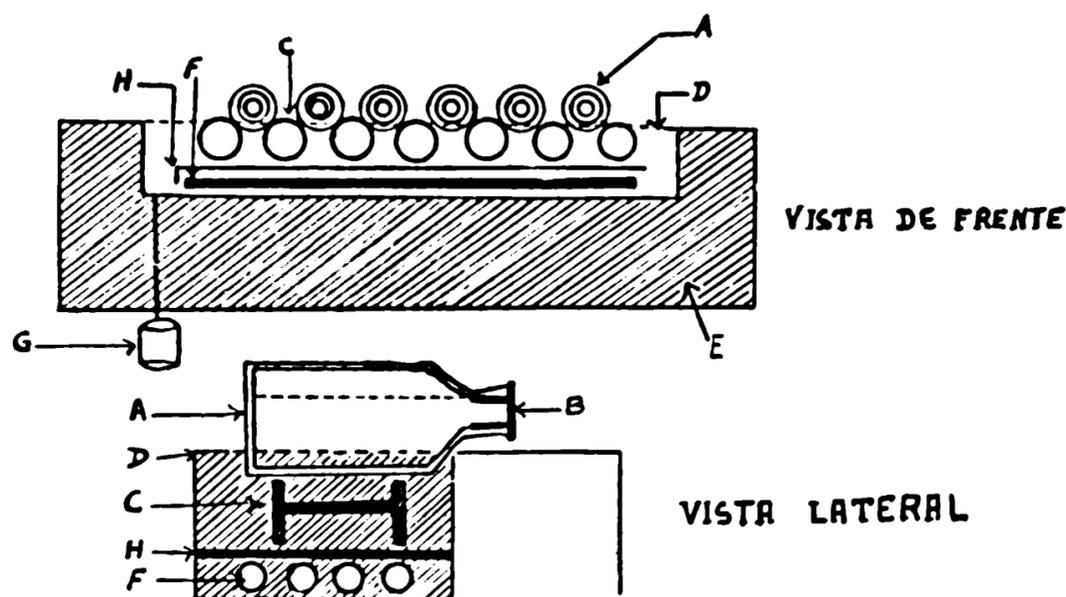
Fotografía nº 1 .-

-----Máquina para congelar los materiales en las paredes de los recipientes en forma de anillo, utilizada en la producción en gran escala.-

Las botellas giran por medio de un dispositivo mecánico en un baño en frío con refrigeración a base de freon (de Flodorf E.W.-18-).-

Strumia Max H. y Mc Graw L. (15), utilizaron un aparato de esta naturaleza para congelar las botellas de plasma, que se ilustra en el esquema nº V .-

Warren J. (29) ha descrito un tipo similar de máquina, para conge-

ESQUENA N° V.--.- Aparato para congelar en anillo .-

----- A - Botella de 400 cm³; B - Tapón de goma; C- Cilindros cubier -
tos con goma; D - Nivel del alcohol refrigerado ;E - Cámara de metal ais -
lador; F - Espirales del evaporador; G - Agitador; H - Tabla para regu -
lar el movimiento del líquido.-

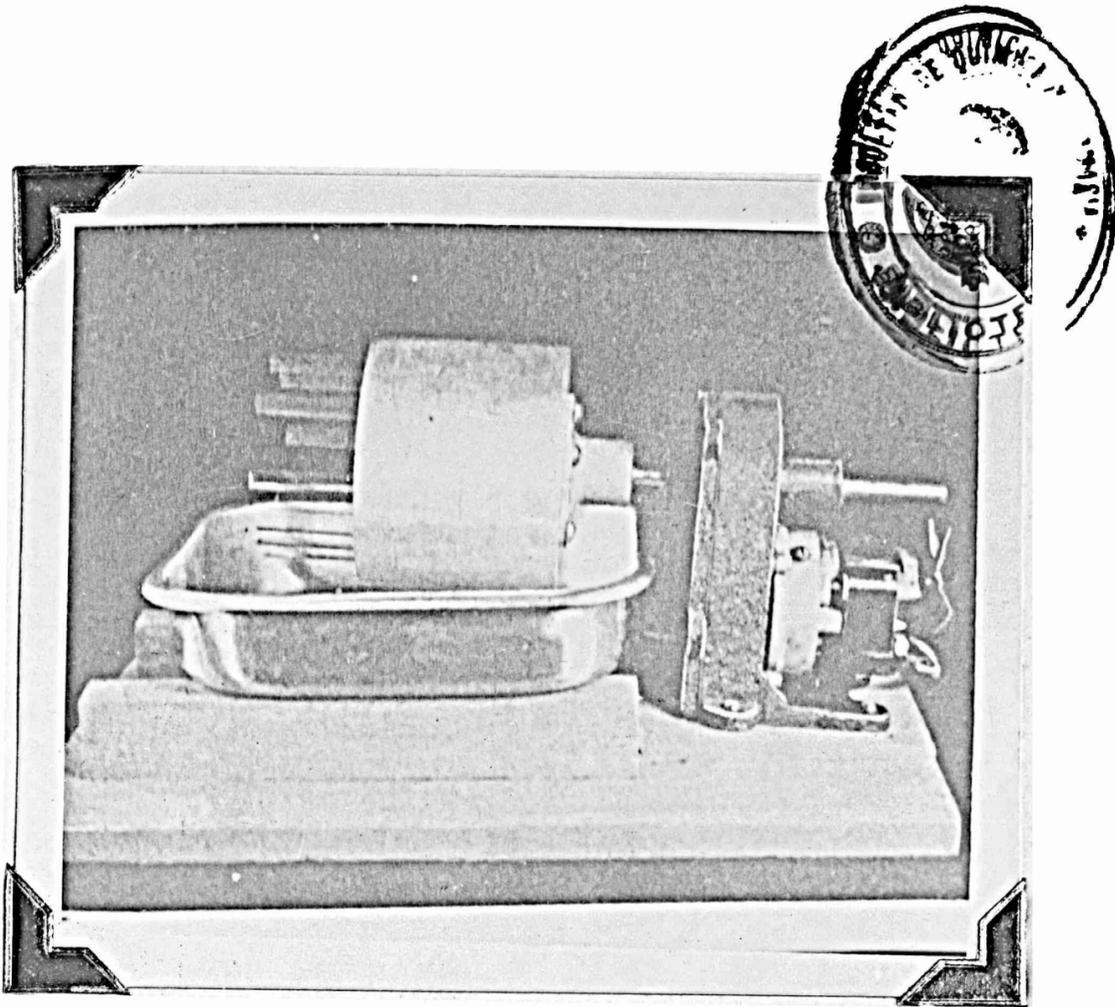
- - - - -

lar material en pequeñas ampollas, consistente en un rotor , que hace -
pasar las ampollas alternativamente en una bandeja con medio congelante.
Este aparato se ilustra en la Fotografía nº 2.-

Ya dijimos que Greaves R.I.M. (25), ha señalado un nuevo método pa -
ra congelar en anillo por centrifugación: las botellas con 400 cm³ de -
suero o plasma, son centrifugadas a una velocidad de 900 revoluciones
por minuto, en una cámara fría a -18°C. En esta forma, el líquido conge -
la en las paredes del recipiente como pequeños cristales. Greaves seña -
la que este método da mayor solubilidad a los productos secados.-

En la industria cuando se usa la pre congelación externa, con cual -
quiera de estos métodos, es necesario disponer de cámaras frías de alma -
cenamiento, para poder juntar el número suficiente de recipientes para
cargar las cámaras.-

Por ello, se recurre más bien a la auto-congelación, que se reali -
za colocando los recipientes dentro de las cámaras de secado, que pue -
den ser enfriadas a la temperatura de subcongelación, y efectuando el -
vacío dentro de las mismas.-



Fotografía nº 2 .-

-----Aparato de Warren para congelar en pequeñas ampollas. (Tomada del libro de Flosdorf E.W. -27-).-

- - - - -

La formación de espuma que ocurre con algunos productos, puede eliminarse por una desgasificación preliminar, que se realiza efectuando un vacío parcial durante media a una hora. De esta manera se eliminan los gases disueltos. Una vez que esto ocurre, se aumenta el vacío, y cuando éste llega a 2,5 a 1 mm. de Hg., ocurre la congelación y comienza la desecación.-

Este método tiene la ventaja de que elimina todas las operaciones de manipuleo en los baños líquidos enfriados, las cámaras de almacenamiento y el transporte de los recipientes a las cámaras de desecación. Por otra parte, se elimina el peligro del deshielo, que puede tener lugar en estas operaciones intermedias. El tipo de cámaras usadas se ilustra en la fotografía nº 4 Pág. 31 .-

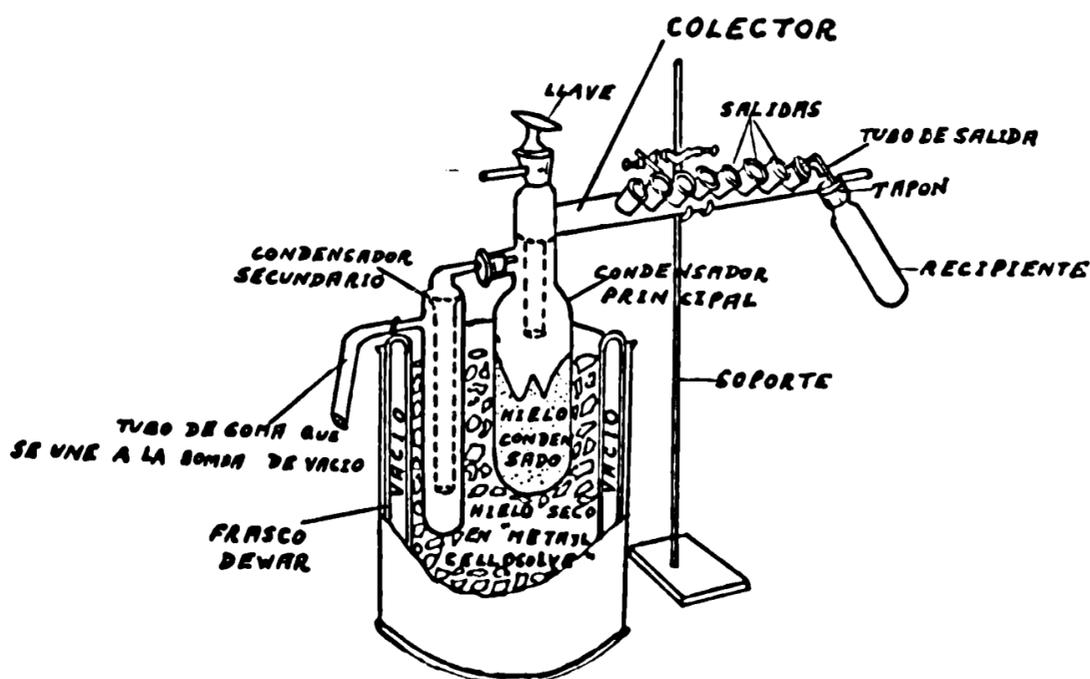
2-CAMARAS DE DESECACION Y COLECTORES PARA LA UNION DE LOS RECIPIENTES:

Los recipientes con el material congelado, deben ser colocados en las cámaras de desecación, o bien unidos a un aparato que hace de intermediario entre el recipiente y el condensador, al cual he designado con, el nombre de colector^(*). Este colector, no es otra cosa que un tubo de vidrio, que tiene una serie de orificios, en los cuales van tapones de goma ajustados, y a través de éstos pasan los tubos de vidrio que los unen a los recipientes con el material congelado. Otros colectores están constituidos por un tubo de metal que lleva en su superficie una serie de tubos de salida individuales, a los cuales se unen los recipientes con el material a secar por un trozo de goma intermediario.-

Uno de estos equipos fué utilizado por Elser W.J., Thomas R.A. y Steffen G.I. (2).-

Flosdorf E.W. y Mudd S.(6), diseñaron un equipo de este tipo para trabajos de laboratorio totalmente de vidrio, cuyas características pueden apreciarse en el Esquema n° VI .-

ESQUEMA N° VI .-

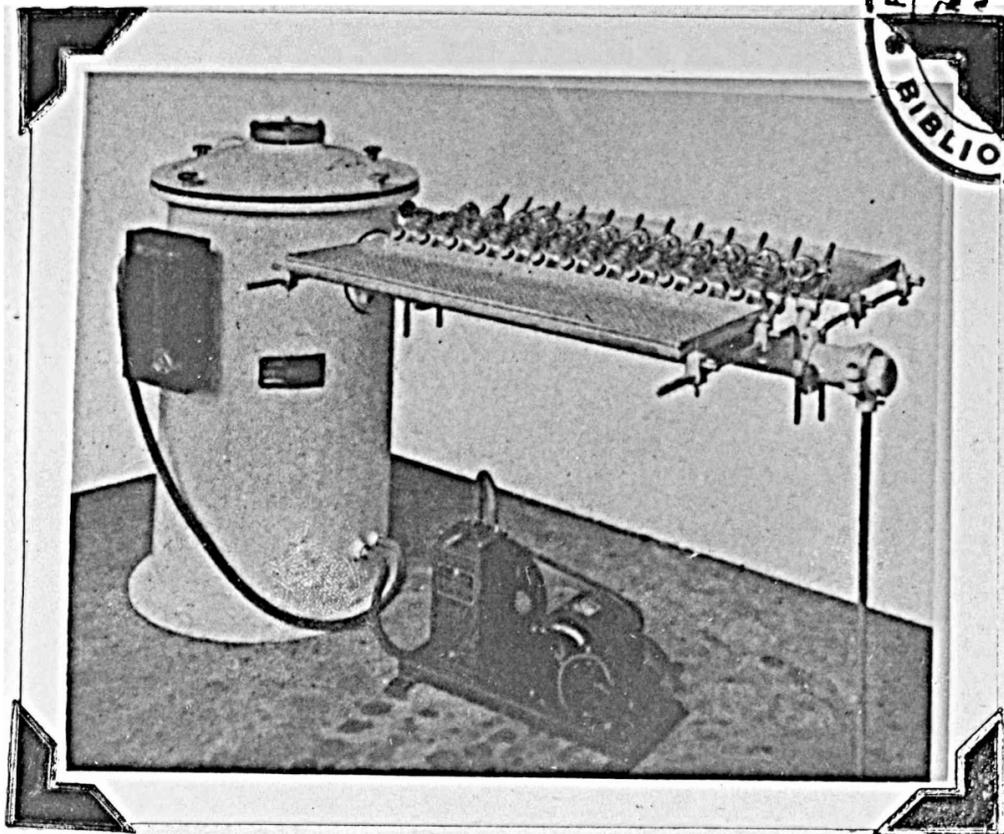


-----Aparato de liofilización utilizado por Flosdorf E.W. y Mudd S.(6)
 -----Se ilustra la forma del colector y cómo se unen los recipientes al mismo, También se aprecian las características del condensador.-

Estos investigadores utilizaron también aparatos de mayor capacidad, contruidos de metal, de características semejantes al anterior, para uso hospitalario y que destinaron a la desecación de plasma, suero de convalescientes y otros productos.-

Flosdorf E.W. y Mudd S.(9), en el método "cryochem", también utilizaron colectores entre los recipientes y la cámara de desecación, cuyos detalles se aprecian en la Fotografía n° 3 .-

(*)Corresponde al término "manifold" utilizado en Estados Unidos .-



Fotografía n^o 3 - Equipo utilizado por Flosdorf E.W. y Mudd S.(9) en el método "cryochem"

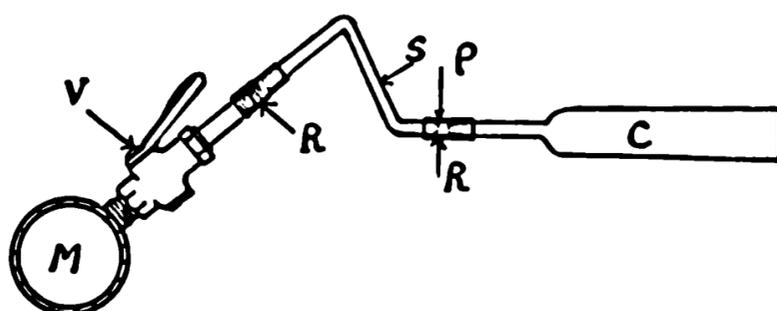
-----Consta de una cámara, que lleva en su interior un agente desecante constituido por sulfato de calcio especialmente preparado, al cual se le puede agregar una pequeña cantidad de gel silícico, para retener otros vapores, además del vapor de agua. Esta cámara está en comunicación con el colector, el cual posee una serie de salidas individuales para la unión de los recipientes con el material a liofilizar.

La pre congelación se realiza desparramando el hielo seco sobre las bandejas que sirven de sostén a los recipientes, o bien por auto-congelación efectuando el vacío por intermedio de la bomba.-

Al final del secado, los recipientes son cerrados a la llama, haciendo previamente el vacío dentro de los mismos.-

En el Esquema n^o VII se aprecia la forma de unión de los recipientes al colector.-

Otros autores han utilizado colectores colocados en posición vertical. Entre ellos están Wyckoff R.W.B. y Lagsdin J.B.(30), que describen un aparato que lo designan con el nombre de "pig". Consta de un cilindro interno, que hace de condensador, pues dentro de él se coloca una mezcla congelante. Este cilindro está aislado por el vacío efectuado durante la operación, de otro cilindro externo colocado concéntricamente. Este último tiene un número variable de tubos de salida del mismo material, a los cuales son unidos por intermediarios de goma los recipientes con el material congelado, que pueden ser ampollas o botellas

ESQUEMA Nº VII .--o. Recipiente unido al colector (9) .-

M - Sección transversal del colector; V - Llave; R - Tubo de goma de unión; C - Recipiente; S - Tubo de vidrio intermediario. Por P se puede hacer entrar aire seco y estéril dentro del recipiente, atravesando el tubo de goma R con una aguja hipodérmica unida al cuerpo de una jeringa por donde se hace entrar el aire secado. Al final del proceso se estrecha el cuello del recipiente, se excluye el aire del mismo y se cierra a la llama .-

+ - - - - -

de 500 a 700 mm.- Flosdorf E. W. (27), señala que los aparatos de este tipo, tienen la ventaja de que el material congelado está muy próximo al condensador, siendo entonces pequeño el trayecto que debe recorrer el vapor de agua. Pero por otro lado tienen la desventaja de que la superficie de condensación resulta pequeña, lo cual hace necesario, cuando se secan productos en cantidades grandes, aislar los recipientes de la atmósfera, con un género o algo semejante, para evitar que el material se descongele. Además, señala que el condensador tiene poca capacidad, lo que hace necesario cargarlo cada hora por lo menos.-

Cuando se utilizan colectores, es necesario controlar la temperatura de los recipientes, de acuerdo con los requerimientos necesarios a medida que prosigue la desecación. Esto puede realizarse controlando la temperatura de la habitación, que al comienzo será baja y luego se elevará gradualmente. También pueden utilizarse para elevar la temperatura de los recipientes, ventiladores que transporten aire calentado sobre lámparas eléctricas, o lámparas infrarrojas con radiaciones sobre los -

mismos. Según Flosdorf E.W. (18) lo mejor es utilizar baños líquidos de aceite u otro material, con los cuales es posible un control más estrecho de la temperatura, debido a que hay una mejor transferencia del calor en el contacto directo de los recipientes con el líquido. Esta operación, generalmente aumenta el costo del equipo; debido a esto y a otras mejoras, es que en los procesos industriales se prefieren las cámaras de desecación.-

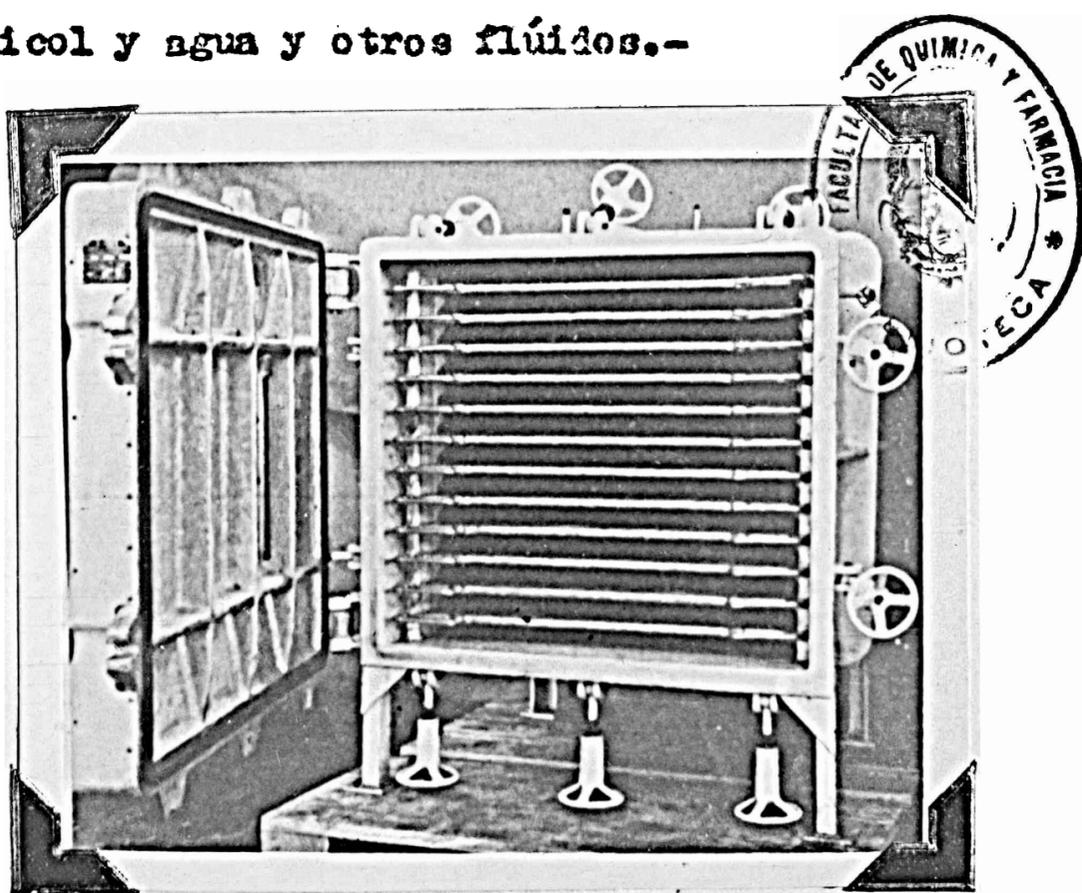
La ventaja de los colectores, está en que es posible secar una variedad grande de materiales, con distintos tipos de recipientes simultáneamente, siendo muy fácil mantener la esterilidad de los mismos.-

Cámaras de desecación:

Para la producción de materiales liofilizados en escala industrial en Estados Unidos, Canadá y otros países, se utilizan cámaras de desecación.-

Son grandes cámaras que están provistas en su interior de estantes, en los cuales se apoyan las bandejas con los materiales a secar. En dichos estantes va un sistema de tubería, por el cual se puede hacer circular un líquido frío para enfriar la cámara y congelar el material en el comienzo del proceso, o un fluido caliente para ir elevando la temperatura a medida que sea necesario con el curso de la operación.-

Flosdorf E.W. (27), dice que los fluidos^{que} se utilizan en las cámaras, no deben tener una gran viscosidad a las temperaturas más bajas utilizadas; no deben ser inflamables; y deben tener un punto de ebullición arriba de la temperatura más alta a la cual es necesario calentar los productos durante la desecación. Señala que el tricloroetileno es el líquido más práctico para este propósito, aunque también pueden usarse mezclas de glicol y agua y otros fluidos.-



Fotografía n° 4 - Cámara de desecación- (Tomada del libro de Flosdorf E. W.-27-)

Estas cámaras son bien aisladas y pueden ser enfriadas hasta una temperatura de -40°C ., con lo cual es posible congelar los productos y mantenerlos a baja temperatura necesaria para el primer tiempo del secado. Al final del proceso, la temperatura puede ser elevada hasta 65°C . o más. Están provistas de dispositivos para que al final del secado, cuando se restablece la presión normal, puede hacerse penetrar aire estéril o nitrógeno.-

3 - CONDENSADORES PARA LA RETENCION DEL VAPOR DE AGUA - UTILIZACION DE AGENTES QUIMICOS - EQUIPOS PARA BOMBEO DIRECTO DEL VAPOR DE AGUA.-

El agua que sublima del producto congelado durante el proceso, es retenida por medio de condensadores, o con substancias químicas absorbentes, o eliminado directamente con las bombas, según el equipo que se utilice.-

a) Condensadores:

Los condensadores utilizados en la liofilización los podemos dividir en dos grupos: Condensadores con hielo seco, y condensadores con refrigeración mecánica.-

Condensadores con hielo seco:

Estos aparatos son de forma diversa y de material variable. Pueden ser pequeños o grandes; construídos de metal o de vidrio.-

En el Esquema nº VI (pág 28) se ilustra un condensador de vidrio - que fué diseñado por Flosdorf E.W. y Mudd S.(6); el condensador propiamente dicho va sumergido en un baño de hielo seco suspendido en un solvente orgánico que puede ser acetona, alcohol, éter, kerosene, tricloroetileno u otro. Flosdorf E.W.(27), dice que el solvente que da mejores resultados es el "methyl cellosolve", debido a su bajo punto de fusión y viscosidad, a su precio razonable, a que es inofensivo y no tiene olor. El recipiente que contiene el solvente orgánico con la nieve carbónica, está aislado para mantener la temperatura.

Hay también condensadores semejantes al descripto, pero construídos de metal.-

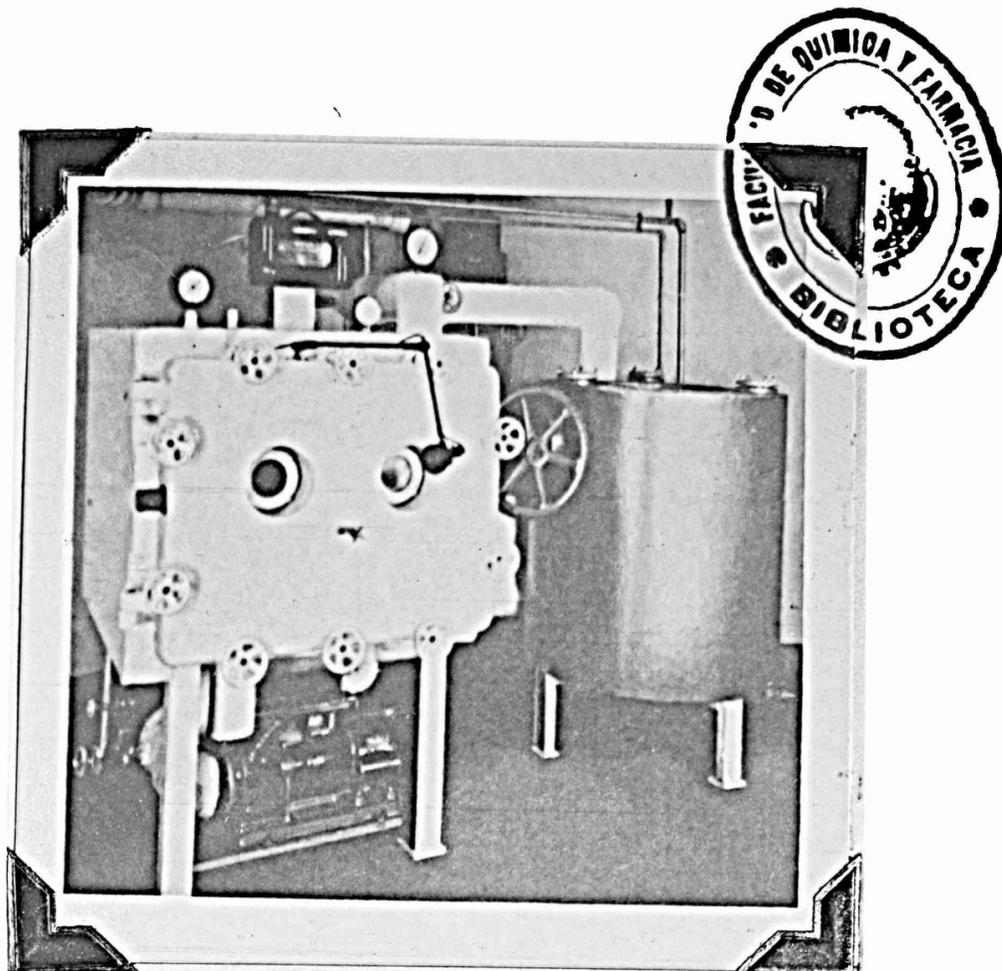
Los tipos de condensadores citados, son de tamaño pequeños para operaciones de laboratorio. Pero se utilizan también equipos de mayor tamaño, como el que se ilustra en la fotografía nº 5.-

Reproduzco también un esquema que corresponde al aparato de la fotografía nº 5.-

Otro tipo de condensador de ésta naturaleza es el de Tyckoff R.W. G. y Lagsdin J.B.(30).-

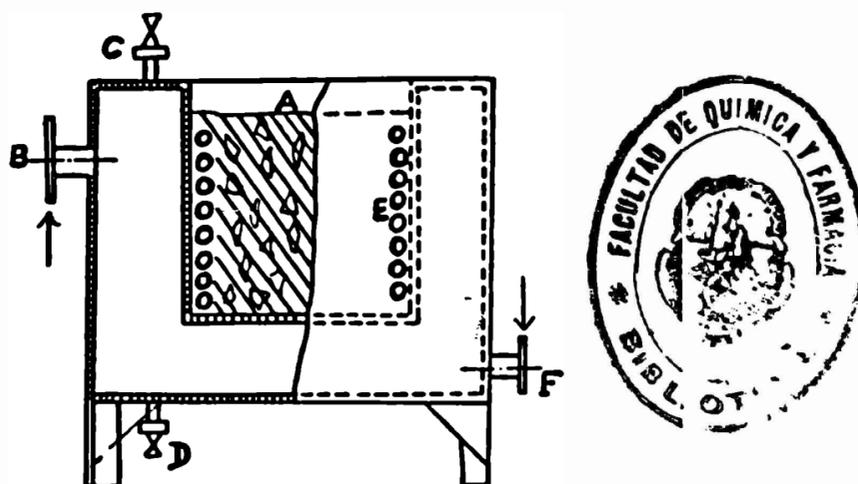
Consiste en dos cilindros concéntricos: uno interno, que es el que actúa como condensador, en el cual se coloca hielo seco con el solvente orgánico; y otro externo que tiene en su superficie exterior tubos de salida de metal, a los cuales se unen los recipientes con el material a secar por intermedio de un trozo de goma. El cilindro interno o condensador queda aislado al hacer el vacío. Un aparato de esta clase utilicé en mis experiencias como se verá en el Capítulo V.-

Los condensadores citados dan una temperatura inferior a $-70^{\circ}\text{C}.$, que será variable según el solvente orgánico que se utilice.-



Fotografía nº 5 - Condensador de hielo seco, que opera en conexión --
con una cámara de secado. (de Flosdorf E.W. -27-)

ESQUEMA Nº VIII .-



.-Condensador que corresponde al aparato de la fotografía nº 5 -.

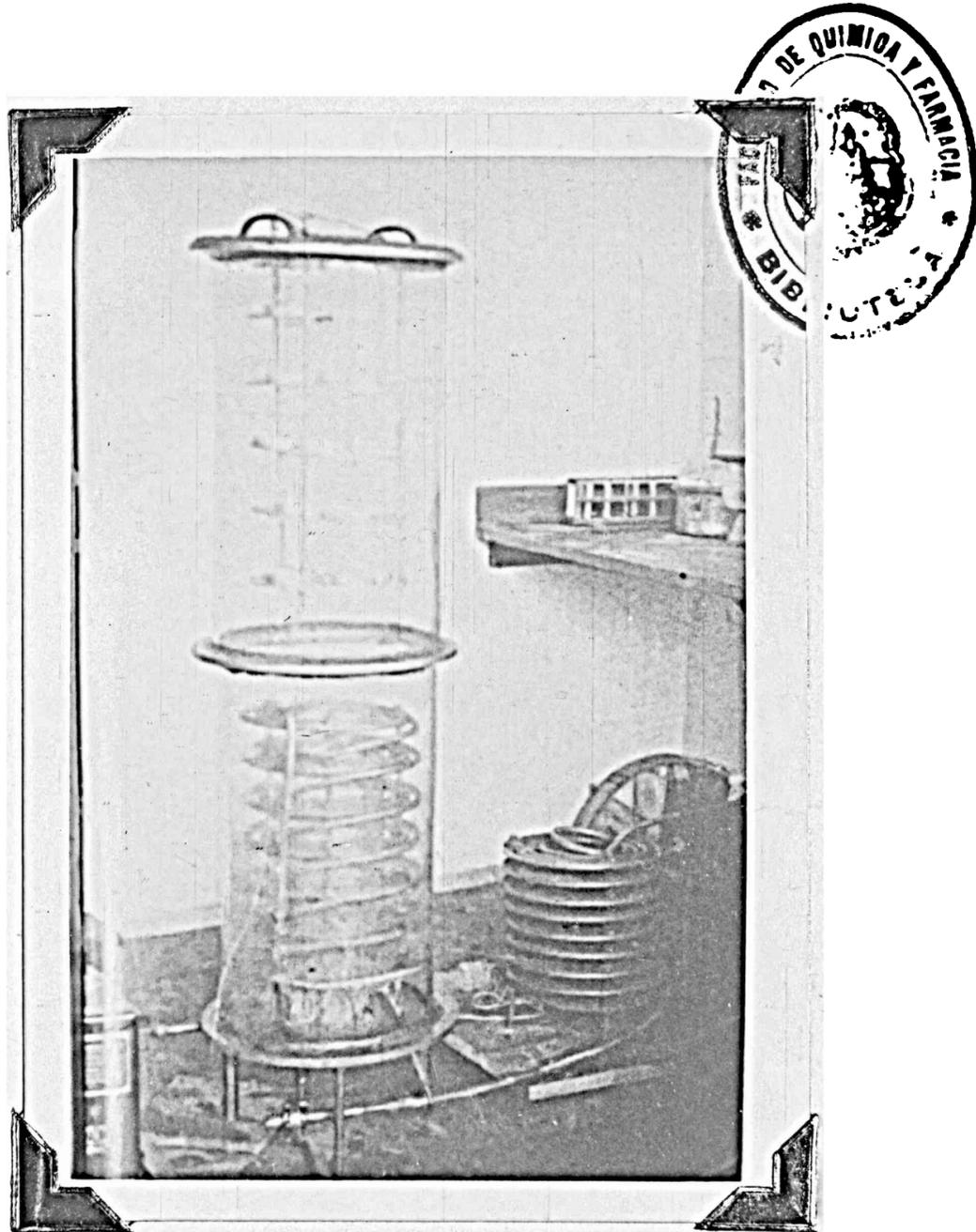
En la parte central va el baño A con la nieve carbónica y el solvente orgánico, el cual queda aislado durante la operación por el vacío que se produce en el sistema por medio de la bomba. Por B se comunica con la cámara de desecación, siendo el punto de entrada del vapor de agua. Por C se puede hacer entrar vapor de agua cuando hay que descongelar después del secado. D sería la salida para el agua. El aparato lleva también espirales E, por donde puede circular un líquido frío si se quiere más baja temperatura. F representa la conexión a la bomba de vacío. (de Flosdorf E.W. -27 -).-

Condensadores con refrigeración mecánica:

Son los que más se utilizan en los procesos industriales por su economía.-

Están provistos de espirales, por las cuales se hace circular - freon, amoníaco, cloruro de metilo, anhídrido sulfuroso u otro líquido por intermedio de un compresor, de acuerdo con los principios bien conocidos que se aplican en los equipos productores de frío.-

Greaves R.I.N. y Adair M.E.(10), utilizaron un condensador en - friado con anhídrido sulfuroso, que se ilustra en la Fotografía nº 6.-



Fotografía nº 6.- Planta experimental de desecación utilizada por Greaves R.I.N. y Adair M.E. (10)

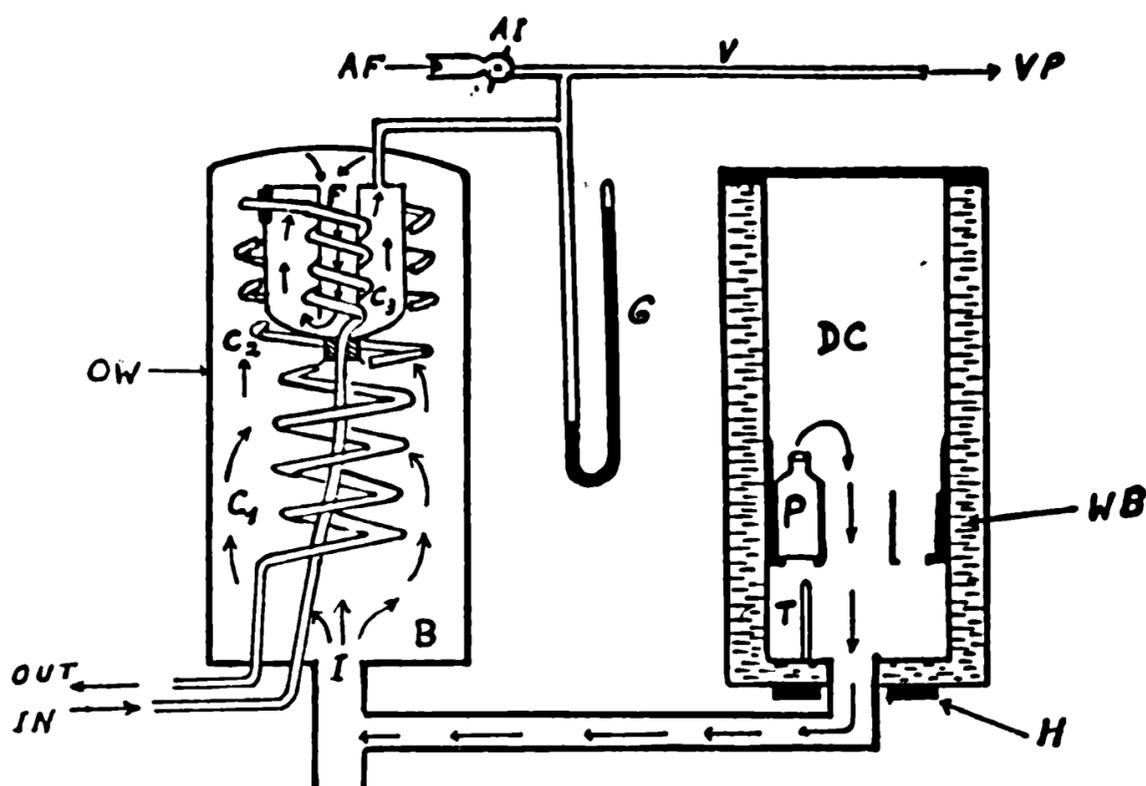
-----Está constituida por dos cilindros de vidrio, unidos en la parte media.

En la zona superior se colocan los materiales a secar distribuidos en ampollas o en un solo recipiente.-

La parte inferior de la cámara constituye el condensador; está provista de espirales de refrigeración en las cuales circula SO_2 .-

También se ilustra a continuación un esquema de la cámara de condensación utilizada por Strumia Max M. y Mc Graw L. (15), enfriada con freon.

ESQUEMA Nº IX .-



Esquema de la planta de desecación de plasma sanguíneo utilizada por Strumia Max M. y Mc Graw L. (15) .-

— IN; entrada de las espirales del sistema de refrigeración del condensador; OUT; salida de las mismas; C₁, C₂, C₃, porciones del serpentín de refrigeración; I; entrada del vapor de agua; B; base del condensador; G; manómetro para la medida del vacío; AF; entrada de aire filtrado; AI; válvula de entrada del aire; VP; unión de la bomba de vacío; H; calefacción para aumentar la temperatura de la cámara al final de la operación; WB; baño de agua; DC; cámara de desecación; P; plasma; T; termómetro.-

Las botellas con el plasma congelado previamente, se colocan en el interior de la cámara y se cierra la tapa de la misma. Estando ya en funcionamiento el sistema de refrigeración del condensador, se pone en marcha la bomba de vacío. El vapor de agua sublima entonces desde la cámara al condensador. La temperatura del agua de la camisa que rodea la cámara, se aumenta al final del secado. Terminada la operación se para la bomba de vacío y se hace entrar aire filtrado a través de la válvula, el cual se seca al pasar por el condensador. Se retiran las botellas, y rápidamente se les coloca tapones de goma que son cubiertos por una sustancia gelatinosa.-

Con estos condensadores enfriados con refrigeración mecánica, se obtienen temperaturas de -30°C a -40°C ., las cuales son convenientes para las condiciones requeridas en la liofilización.--

El deshielo de los mismos se efectúa fácilmente haciendo circular agua u otro fluido caliente por las espirales.--

b) Aparatos para la retención del vapor de agua con agentes químicos:

Como hemos dicho anteriormente, en este tipo de equipos se utilizan cámaras en las cuales se colocan sustancias químicas que retienen el vapor de agua extraído del producto que se está secando.--

Flosdorf E.W. y Mudd S.(9) utilizaron un equipo de esta naturaleza en el método "cryochem", cuyas características se aprecian en la Fotografía nº 3, pág. 29. En la misma se ve la cámara de retención del vapor de agua, en el interior de la cual se coloca sulfato de calcio especialmente preparado, al cual se le suele agregar a veces gel silícico, para retener otros vapores que no sea el de agua. Se ve también el colector para la unión de los recipientes que llevan el material a secar, y que -- pueden ser congelados colocando hielo seco en la bandeja que los sostiene. Al final de la operación los recipientes son cerrados al vacío con un soplete.--

El sulfato de calcio es el desecante químico que más se ha utilizado, por tener gran capacidad para retener el vapor de agua y por ser fácilmente regenerable. También se han propuesto otras sustancias, como el perclorato de magnesio, pero éste es más difícil de regenerar; el cloruro de calcio es algo deliquescente y resulta poco ventajoso.--

Pueden ser utilizados adsorbentes físicos como el gel silícico y la alúmina. Estos fueron empleados por Hill J.M. y Pfeiffer D.C.(11), -- quienes señalan la gran conveniencia del gel silícico, debido a su gran capacidad de adsorción, que le permite retener hasta un 30% de su peso de agua. Además, como la unión con el agua es de carácter físico, dicen que no ocurre deteriorización apreciable al eliminar el agua del desecante por el calor, lo que hace que pueda ser usado indefinidamente.--

La capacidad del adsorbente depende no sólo de la presión del vapor a que está expuesto, sino también de la temperatura del gel mismo. Cuando el adsorbente retiene el agua se libera una cierta cantidad de -- calor, que al elevar la temperatura del adsorbente, tiende a reducir su capacidad de adsorción. Los autores mencionados solucionan este problema enfriando el desecante por un sistema de refrigeración.--

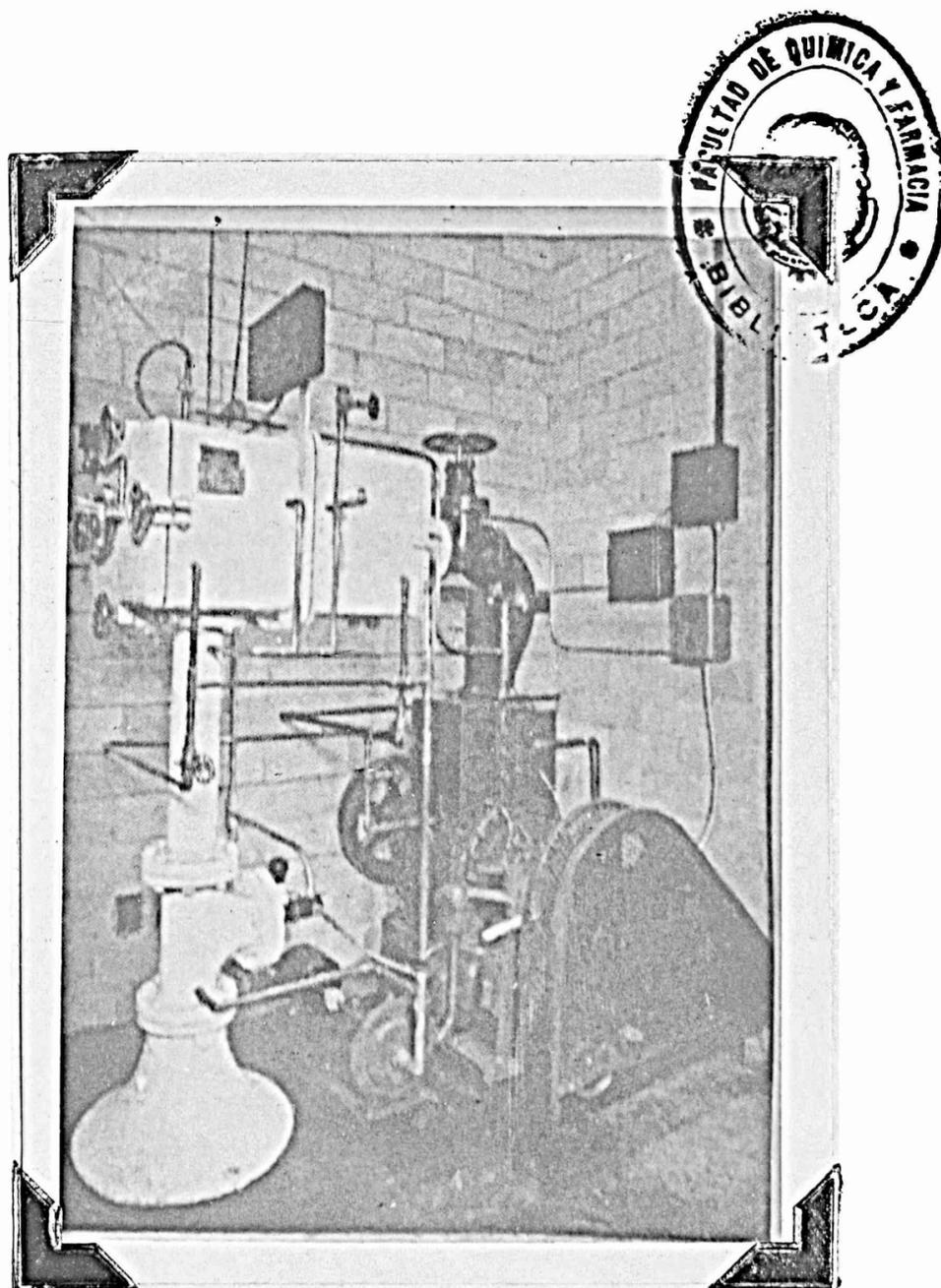
La retención del vapor de agua con agentes químicos, resulta ventajosa para operaciones en pequeña escala. Para la producción en gran escala, la regeneración de grandes cantidades de desecantes, no resulta --

conveniente ni práctica. Estaría indicado su uso para zonas donde no se dispone de hielo seco, y donde no se justifique la instalación de una planta con condensadores refrigerados mecánicamente, por la magnitud de la operación.-

c) Equipos para la eliminación del agua por bombeo directo:

En este método, el vapor de agua que sublima del producto congelado es eliminado directamente del sistema, por intermedio de las bombas de vacío.-

La concepción de éste método se debe a Flosdorf E.W., Stokes F.J. y Mudd S. (12) quienes utilizaron un equipo que se ilustra en la Fotografía nº 7.-



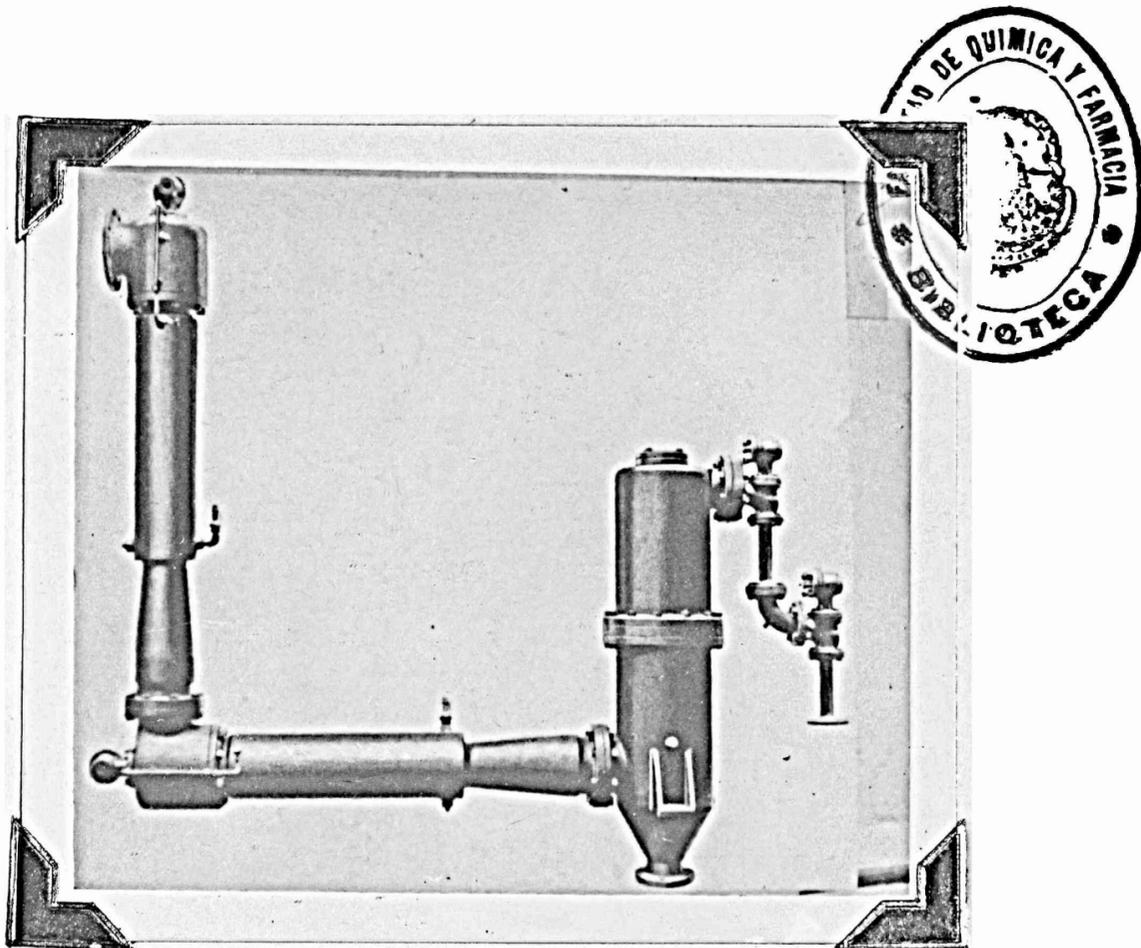
Fotografía nº 7 - Equipo utilizado por Flosdorf E.W., Stokes F.J. y Mudd S. (12), en el método "desivac" .-

La cámara de secado está conectada directamente a la bomba de vacío. Durante la operación el agua es eliminada continuamente de la bomba, manteniendo el aceite a baja presión.-

Utilizan para ello bombas de gran capacidad volumétrica, en las cuales circula el aceite usado en el cierre u obturación de vacío, en --

vez de tener un baño estático de aceite. Por medio de un dispositivo (una centrífuga operando continuamente, o clarificador centrífugo), el agua se separa de la emulsión aceite-agua, y el aceite clarificado vuelve nuevamente a la bomba. De esa manera tienen siempre disponible aceite a baja presión de vapor para el cierre de alto vacío de la bomba.-

Para operaciones en gran escala, se usan preferiblemente eyectores de vapor con condensadores intercalados, que tienen una capacidad mucho mayor para eliminar el gran volumen de vapor de agua que se desprende. En la Fotografía n.º 8 podemos ver uno de estos eyectores de vapor.-



Fotografía n.º 8 - - Ejector de vapor para el bombeo directo del vapor de agua.-

Con este método se puede operar a una presión inicial de 4,5mm de Hg. sin que los materiales se descongelen, y al final del secado la bomba produce un presión debajo de 200 micrones, con lo cual el contenido de humedad del producto secado se lleva debajo del 1%.-

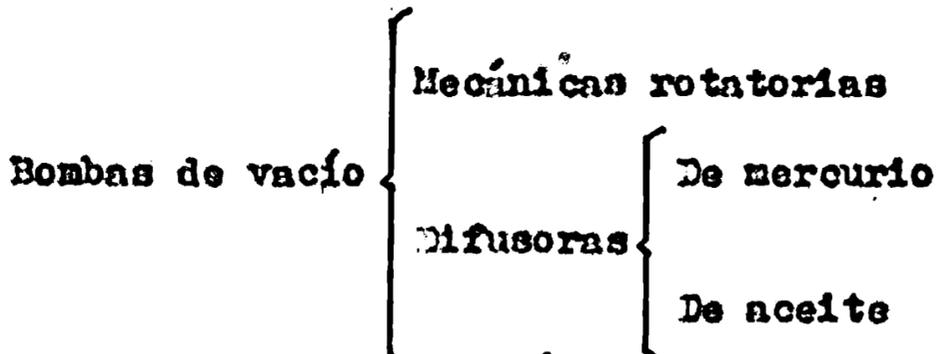
Operando con condensadores, la presión por lo general está debajo de 200 micrones. Los desecantes químicos permiten una presión más alta, hasta 1 a 2 mm. debido a su capacidad para retener el vapor de agua.-

4 - EQUIPOS PARA PRODUCCION Y MEDIDA DEL VACIO 6-

En el proceso de liofilización es necesario contar con aparatos para la producción del vacío, ya que es preciso eliminar del sistema el vapor de agua y los gases no condensables, como así también los gases que se encuentran disueltos en el producto que se seca.-

Debe disponerse entonces de una bomba de alto vacío conveniente.-

Las bombas de vacío se las puede clasificar en dos grandes grupos a saber:



Voy a omitir la descripción y funcionamiento de cada una de los tipos de bombas, que puede consultarse en cualquier manual, indicando solamente cuales son las que se utilizan en el proceso de liofilización.

Las bombas rotatorias mecánicas son las más ampliamente usadas, porque con ellas puede obtenerse el grado de vacío necesario para la desecación, siendo además las que más comúnmente se tienen disponibles en cualquier laboratorio.-

Por otra parte, la mayoría de las veces no es necesario disponer de un vacío más alto, como aquel que puede obtenerse con las bombas difusoras. En efecto: según indica Flosdorf E.W. (27), la presión parcial del vapor de agua en el sistema, depende de la temperatura del condensador o de la eficacia del agente químico, y de la temperatura y grado de sequedad de la sustancia a secar. Además, la presión parcial del aire residual en el sistema dependerá de la entrada de aire que pueda haber en el mismo (pérdidas) y de la eficacia de la bomba utilizada. Por consiguiente agrega, que no es necesario que la bomba evacúe debajo de las presiones correspondientes a la temperatura del condensador, pero sí, que tenga suficiente capacidad como para prevenir la concentración de los gases no condensables en el condensador. Cita el siguiente ejemplo: si la temperatura del condensador es de -40°C ., la presión de vapor del hielo a esa temperatura será de 90 micrones. Entonces, en esas condiciones pasará por el sistema vapor de agua a una presión de 90 micrones — arrastrando el aire residual con él. A esta temperatura del condensador, no hay necesidad de tener un vacío más alto, ya que la presión solamente llegaría a igualar a la presión que corresponde a la temperatura del condensador.- En otras palabras, si se quiere producir la aspiración a una presión, debajo de la que corresponde a la temperatura del condensador, no se obtiene ninguna ventaja, porque la bomba sólo extraería hielo del condensador.-

Como los condensadores que se utilizan operan a una temperatura de -30° a -40°C. , el rango de presión que corresponde a esa temperatura es de 100 a 300 micrones.-

Estos niveles de presión son fácilmente obtenibles con las modernas bombas de vacío mecánicas tipo rotatorio, no siendo necesario por lo tanto recurrir a las bombas difusoras.-

Cuando se usan desecantes químicos, como el sulfato de calcio(9),- se puede trabajar a presiones más altas, debido a que los agentes químicos producen una presión parcial de vapor de agua baja en el sistema.-

Las bombas de vacío deben colocarse próximas al resto del equipo, y las tuberías de unión deben ser herméticas y de diámetro conveniente, con codos suaves, no agudos.-

Cuando se trabaja en grandes plantas industriales, como ocurre en la desecación de alimentos, es necesario tener mayor capacidad de evacuación del vapor de agua. Se recurre entonces a los eyectores de vapor de 4 o 5 tiempos, con uno o más condensadores intercalados.-

Nivel de vacío:

El rango de vacío que se utiliza en la desecación por el método de liofilización, es por lo general de 100 a 300 micrones, pudiendo llegar a 2 o 3 mm., según el equipo que se utilice, la substancia que se esté secando, o el momento del ciclo del secado que se considere.-

Este nivel de vacío está comprendido dentro de lo que hoy se conoce como alto vacío.-

Para la medida del alto vacío se utilizan manómetros especiales.-

Los manómetros comunes de mercurio en U, sirven para medir la presión absoluta, pero carecen de sensibilidad, de modo que solamente pueden servir como auxiliares durante la liofilización.-

Entre los manómetros utilizados para la medida del alto vacío, tenemos los manómetros termo-eléctricos, los de ionización de gases y los manómetros tipo McLeod.-

Manómetros termo-eléctricos:

El principio en que se basan es el siguiente; Cuando se calienta un filamento en un recipiente lleno de un gas a una presión bastante baja, para que su coeficiente de conductibilidad térmica varíe con la presión, este filamento adquiere una cierta temperatura.-

Esta temperatura de equilibrio es despreciable, cuando la pérdida de energía por radiación, conducción y convección, es igual al aporte de energía por la corriente eléctrica.- Si se arregla de modo que las pérdidas por radiación, conducción y convección, sean despreciables frente a las pérdidas debidas al transporte de energía por las moléculas del gas que choca sucesivamente el filamento y las paredes, la temperatura del -

filamento, para un aporte de energía determinado, será función única - mente de la presión del gas.-

El filamento está formado por una serie alternada de dos metales, dando lugar a una fuerza electromotriz termo-eléctrica; las soldaduras impares son enfriadas y las soldaduras pares están lo más lejos posible de las soldaduras frías. Cuando se calienta este filamento así constituido, las temperaturas pares toman una temperatura de equilibrio, que depende de la conductibilidad del medio ambiente y de la intensidad de la corriente de calentamiento, mientras que las soldaduras impares permanecen a una temperatura constante. Aparece entonces en las extremidades del filamento, una fuerza electromotriz, que es función de la presión que se quiere medir, la cual se puede leer sobre la escala de un milivoltímetro.-

El manómetro es sensible en el rango de 1 a 100 micrones.-

Flosdorf E.W. (27) señala que este tipo de manómetro no es conveniente usarlo en la liofilización debido a lo siguiente: El vapor de agua, el hidrógeno y otros gases, conducen el calor en mayor extensión que el aire a la misma presión, y por consiguiente un manómetro calibrado con aire daría lecturas inexactas con otros gases o vapores. En la liofilización, en los distintos momentos del secado cambia la proporción de vapor de agua y aire, y por consiguiente sería requerida una calibración diferente en los distintos tiempos. Por otra parte, la pérdida de aire en el equipo puede variar de un día a otro, y sería otro factor de error cuando se quiere trabajar en condiciones uniformes.-

Sin embargo, otros autores, como Greaves R.I.N. y Adair M.E. (10), quienes utilizaron un manómetro Pirani que pertenece a este tipo, recomiendan su uso.-

Manómetros de ionización de gases:

Están basados en la conductibilidad eléctrica de los gases ionizados. Si se establece un campo eléctrico de sentido conveniente entre dos electrodos, en donde el uno es una fuente de electrones (por ejemplo un filamento de platino o de tungsteno llevado a la incandescencia) se produce una corriente electrónica del cátodo hacia el ánodo. Los electrones que componen esa corriente, encuentran las moléculas del gas residual, dando lugar a una ionización por el choque.-

El número de iones positivos formados es proporcional a la presión del gas. Recogiendo esos iones positivos en un tercer electrodo, o placa con un potencial negativo, se establece una corriente proporcional a la presión. Por medio de un medidor en el circuito de la placa, es medida la corriente iónica para indicar directamente el vacío en micrones.-

Estos manómetros permiten medir presiones entre 10^{-3} y 10^{-7} mm. - de mercurio.-

Floedorf E.W. (27), señala para este tipo de manómetros el mismo inconveniente que en los anteriores.-

Manómetro McLeod:

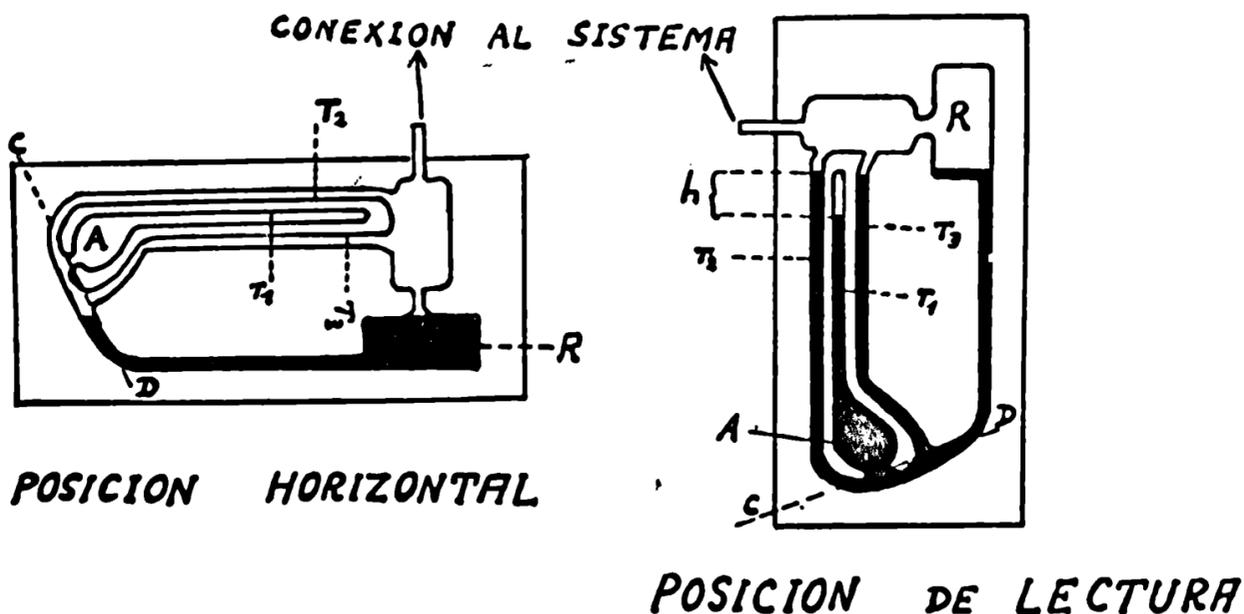
Este manómetro ofrece una serie de ventajas, de aquí que sea el aparato más recomendable para la medida del vacío en la desecación por el método de liofilización.-

No requiere ni baterías ni conexiones eléctricas; tiene un rango de medida de vacío muy amplio que va desde una fracción de micrón a 5000 micrones; los gases no causan errores como en el caso de los manómetros anteriores.-

Descripción: El principio del manómetro McLeod se basa en la Ley de Boyle y Mariotte, que establece que a una temperatura constante, la presión de un gas es directamente proporcional a su densidad, e inversamente proporcional a su volumen.-

El volumen de la cámara A (esquema nº X), medido a partir de la línea CD es conocido.-

ESQUEMA Nº X.-



- Manómetro McLeod -

El volumen del tubo capilar T1 es perfectamente determinado. Los tubos T2 y T3 se comunican con el sistema de vacío. En el reservorio R hay una cantidad de mercurio que permite llenar el recipiente A, y los tubos T1, T2 y T3.-

Cuando se quiere efectuar una lectura del vacío, el mercurio del

recipiente R, se hace entrar en la cámara A. Para realizar esta operación algunos tipos de manómetros son inclinados colocándolos en posición vertical; otros llevan una ampolla de mercurio, y levantando la misma el mercurio penetra en la cámara A. Cuando el nivel del mercurio alcanza la línea CD, queda encerrado un volumen de aire V en la cámara A y en el capilar T₁. Antes de ello la presión en la cámara A y en el capilar, es igual a la presión en el sistema de vacío x, al cual está conectado por los tubos T₂ y T₃, que es lo que se quiere medir.

A medida que el mercurio se eleva en el recipiente A, y en el tubo T₁ (y también en los tubos T₂ y T₃) el volumen de gas en la cámara A, es comprimido en el pequeño capilar T₁. Supongamos que se haya llegado a comprimir el gas hasta un volumen v, su presión será x+h, siendo h la diferencia de nivel de mercurio.

Por la Ley de Boyle y Mariotte tendremos:

$$v \cdot (x + h) = V \cdot x$$

Para valores muy pequeños de x puede escribirse:

$$v \cdot h = V \cdot x$$

de donde: $x = \frac{v}{V} \cdot h$

El volumen del tubo capilar v se conoce. V, o volumen de la ampolla A viene definido por construcción misma del aparato. De modo que -- basta leer h, para obtener el dato de la presión x --

Todos los manómetros traen una escala donde se lee h, indicando -- directamente la presión en micrones --

Floedorf E.W. (31), ha señalado los errores que pueden cometerse -- con éste manómetro cuando existen vapores condensables en el sistema. En efecto, cuando estos vapores son comprimidos en el capilar T₁, si la -- presión ejercida alcanza la presión de condensación (lo que varía con la temperatura) el vapor condensa y como resultado de la contracción; el mercurio; ascenderá más en el tubo capilar, indicando un vacío más -- perfecto que el que en realidad existe. Indica la manera de corregir es -- tos errores, señalando que lo más práctico es recurrir a trampas químicas.--

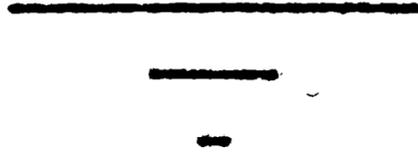
Comunmente los manómetros traen un compuesto químico seleccionado, que permite retener el vapor de agua y otros compuestos tales como alcohol y aceites que dan errores semejantes. Estos compuestos químicos tienen agregado un indicador, que determina el momento que debe ser reemplazado por nuevo material.--

También pueden utilizarse trampas de condensación con hielo seco o aire líquido para excluir la humedad, pero resultan menos prácticas.--

Floedorf E.W. (31), señala que las trampas químicas o de condensa-

ción, hacen que el manómetro señale la presión verdadera en el sistema, aunque solamente entre aire seco en el manómetro en todo momento.-

Dice que el aire se acumula en cantidad de modo que su presión — equilibra exactamente la presión total de vapor de agua y aire en el sistema, en el otro lado de la trampa.-



IV - PRINCIPALES APLICACIONES DEL METODO
DE SECADO POR LIOFILIZACION.

IV - PRINCIPALES APLICACIONES DEL METODO DE SECCADO POR LIOPILIZACION:-

Las aplicaciones de la desecación por el método de liofilización son muy numerosas actualmente, lo cual es un índice de los resultados obtenidos.-

Los productos que se secan podemos incluirlos en dos grandes grupos:

Productos médicos .-

Productos alimenticios .-

PRODUCTOS MEDICOS .-

Si bien es cierto que cuando se seca cualquier sustancia, es necesario mantener su esterilidad durante el proceso y almacenamiento, para asegurar su conservación, esto es absolutamente indispensable en el caso de los productos médicos, ya que la mayoría de ellos se usan por vía parenteral.-

Es por eso que generalmente se desecan en las ampollas o recipientes finales, en los cuales se los almacena y distribuye.-

Voy a enumerar a continuación las sustancias que se han secado y conservado con éxito dentro de este campo.-

1 - Suero humano de convalecientes.-

Es éste el primero de los productos médicos al cual se aplicó la liofilización.-

Se sabe que el suero obtenido al final de ciertas enfermedades, especialmente enfermedades de los niños, puede tener valor como preventivo en posteriores epidemias. El problema de la deteriorización de estos sueros, ha sido resuelto con la liofilización, que permite la conservación durante dos o tres años, con mantenimiento de su potencia original.

No es necesario agregar ningún conservador al suero, pero por lo general se prefiere añadir algún agente como el merthiolate, con el objeto de disminuir el peligro de contaminación, al ser restaurado el estado líquido en el momento de su uso (27) .-

Estos sueros se someten generalmente al control de reacciones serológicas para diagnóstico de la sífilis, pero inclusive no sería necesario ya que está probado que la espiroqueta pálida no sobrevive después de la desecación (32).-

De esta manera pueden conservarse sueros de convalecientes de sarampión, escarlatina, viruela, paperas y otras enfermedades.-

Por otra parte, ha sido señalado que el suero de sujetos normales da resultados satisfactorios en la inmunización y tratamiento contra la viruela, el sarampión, escarlatina y coqueluche (33) .-

En definitiva, cualquiera sea el suero que se utilice, lo importante es que puede ser almacenado largo tiempo inalterable, y ser aplicado con resultados clínicos semejantes al de un suero líquido fresco.-

2 - Plasma y suero sanguíneos humanos.-

El plasma sanguíneo humano y el suero pueden secarse y conservarse con resultados excelentes por el método de liofilización.-

Fue en 1935 que Flosdorf E.W. (6), secó por primera vez el plasma sanguíneo al estado congelado, en los recipientes finales para su distribución y aplicación en clínica médica.-

Es bien conocida la gran aplicación que tienen estos productos - en transfusiones para el tratamiento de las hemorragias, shocks secundarios, toxemias, quemaduras, etc.-

El plasma humano normal al estado líquido puede conservarse algunos meses a una temperatura alrededor de la temperatura ambiente (27),- pero pierde una serie de propiedades : la contaminación bacterica ocurre muy fácilmente y constituye un gran riesgo; se pierden los componentes lábiles como los factores de la coagulación y muchos anticuerpos.-

Esto indica que no reuniría las condiciones exigidas para uso médico.-

El plasma puede conservarse congelado. En esta forma se conserva bien, pero la desventaja descansa en que son necesarias cámaras de congelación para su almacenamiento y distribución. Además la restauración o descongelación requiere un tiempo cinco o diez veces mayor que la disolución del plasma liofilizado.-

El plasma desecado por liofilización es estable durante cinco años sin refrigeración, y es disponible instantáneamente para transfundirlo dentro de los cinco minutos después de agregarle agua para su restauración.-

El plasma y suero sanguíneos humanos fueron usados en grandes cantidades para el tratamiento de los accidentes durante la pasada guerra. Actualmente, en muchos países existen plantas de desecación de plasma, siendo un medicamento de uso diario en hospitales y sanatorios

Entre nosotros hace ya algunos años que funcionan algunas plantas de desecación de plasma. Entre ellas se encuentra la planta del Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires, con sede en la Ciudad de Eva Perón, que abastece a muchos hospitales de esta Provincia.-

Flosdorf E.W. (27), cita una publicación de Barondes R. (34), según la cual el plasma secado ejercería efectos benéficos por vía oral

para el tratamiento/desórdenes gastrointestinales, como hiperclorhidias, gastritis, úlceras y diarreas. Dicen que el plasma actúa como un buffer para la acidez gástrica ejerciendo una acción calmante sobre los tejidos enfermos e inflamados; ayuda a la regeneración de los mismos y posee propiedades antitóxicas y antibióticas. Establecen que puede prescribirse con mezclas frías agradables, o en cápsulas con capa entérica, o mezclado con polvo de manzana, que es un coadyuvante en el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales.-

El plasma o suero es secado en cantidades de 200 a 300 ml. en recipientes de 500 ml. de capacidad por lo general. Terminado el secado, los recipientes se cierran con tapones de goma, y a través de ellos se hace el vacío.-

Como los tapones de goma son algo permeables a la humedad, sobre todo en las zonas donde hay elevada temperatura y humedad, en Estados Unidos suele colocarse el recipiente de vidrio dentro de otro de metal, para asegurar una mayor protección. También pueden utilizarse recipientes o ampollas totalmente de vidrio, que se cierran herméticamente a la llama.-

El plasma secado por liofilización se presenta como un material liviano de naturaleza porosa, que puede ser reducido fácilmente por sacudimiento a un polvo mullido. Es de color ambar claro, siempre que el producto original no tenga mucha hemoglobina. Es muy soluble en agua: el polvo resultante de 300 ml. de plasma puede disolverse en 250 ml. de agua destilada apirógena en un tiempo de alrededor de un minuto. A veces se lo disuelve también en una solución de ácido cítrico al 0,1% (15) .-

El plasma desecado conserva sus propiedades originales: tiene un contenido máximo de complemento y de protrombina; las proteínas no sufren ninguna alteración química determinable: se han hecho estudios por electroforesis con muestras de plasma desecado obteniéndose datos normales (35). Presenta una ligera turbidez que se atribuye a los componentes lipídicos de naturaleza líofoba (18), pero dicha turbidez no afecta en nada el producto, el cual es perfectamente utilizable para inyección endovenosa sin que cause reacciones. El pH del plasma liofilizado y reconstituido con agua destilada varía de 8,2 a 9,3; el mismo regenerado con solución de ácido cítrico al 0,1% varía de 7,4 a 7,8 (15); este aumento de pH se debe a la pérdida de CO_2 durante el proceso, y hay que hacer notar, que esa alcalinidad no constituye ningún inconveniente para su uso. El contenido final de humedad es por lo general inferior al 1% .-

El plasma secado por liofilización, cuando es envasado en perfectos

tas condiciones, mantiene sus propiedades durante varios años.-

También se ha aplicado la liofilización para desecar algunas fracciones del suero o plasma. Según Floedorf E.W.(27), la albúmina de suero, la pseudoglobulina, la euglobulina y el fibrinógeno, como también las sustancias lábiles como la protrombina, secadas por liofilización, son perfectamente solubles y mantienen su actividad biológica durante un año o más. Cita que Cohn y sus colaboradores (36), han separado diferentes fracciones del plasma, que pueden ser luego secadas al estado congelado, obteniendo productos estables purificados, que pueden ser fácilmente re-disueltos.-

La albúmina de suero desecada, y luego re-disuelta se ha utilizado en vez del plasma sanguíneo. La principal ventaja de su uso fué durante la guerra en los bandos de desembarco, donde era necesario llevar pequeños volúmenes.-

3- Substitutos del plasma sanguíneo humano.-

Muchas son las substancias que se han ensayado para reemplazar el plasma sanguíneo, pero hasta el presente, las únicas que han dado resultados efectivos, son la albúmina de suero humano, a la que ya me referí, y las soluciones de gelatina.-

Las soluciones de gelatina desecadas por liofilización, originan un producto con excelente solubilidad. En efecto, ordinariamente debe disolverse en agua caliente, mientras que una vez secada por liofilización se disuelve rápidamente en agua fría.-

La gelatina es una proteína incompleta, por eso se suele agregar a las soluciones, aminoácidos o hidrolizados de proteínas para reforzar su contenido proteico, y el producto resultante, secado bajo condiciones asépticas, puede usarse como sustituto del plasma sanguíneo (27).-

Se han ensayado también polisacáridos de la goma acacia, pectina, y globulinas derivadas de los eritrocitos, pero con resultados poco satisfactorios, debido a las reacciones que producen algunos de ellos, al ser inyectados(37).-

Actualmente se está ensayando en Estados Unidos el dextrán, polisacárido constituido de multitud de moléculas de glucosa. Parece que es un producto de bajo costo, fácilmente soluble, que puede restaurar la presión arterial, y aumentar el volumen sanguíneo en forma semejante al plasma, en el tratamiento del shock.-

También se encuentra en estudio la polivinilpirrolidona, que es un producto obtenido por vía sintética.-

Otro sustituto del plasma humano, que actualmente está en estudio es el plasma obtenido de animales(vacunos y equinos), que desensibiliza-

de por un tratamiento especial, sería aplicable en la medicina humana. En el caso de que lleguen a utilizarse los plasmas heterólogos, el secado — por liofilización sería el método ideal para asegurar su conservación, almacenamiento y distribución.—

4 - Antitoxinas .-

Del mismo modo que se conserva el suero humano, se pueden conservar los sueros de animales, y junto con ellos ciertos anticuerpos. Por ejemplo: la antitoxina diftérica líquida pierde su actividad en pocos meses, mientras que secada por liofilización, conserva sus propiedades por lo menos durante tres años. Transcribo a continuación datos pertenecientes a Flodorf E.W. y Mudd S. (18).—

Disminución de la potencia de la antitoxina diftérica, almacenada a 37°C en recipientes de vidrio .-

	Humedad inicial	Potencia: unidades por ml.				
		Inicial	6 semanas	6 meses	18 meses	3 años
Líquido	-	550,	550	45	0	-
Seco	0,5%	550	550	550	550	450
Seco	5 a 8 %	550	45	insoluble	-	-

Flodorf E.W. (27), dice que ciertas antitoxinas una vez secadas sufren inicialmente una pérdida de potencia, pero luego se mantienen alcanzando un estado estable durante cierto tiempo. De ahí, que señala que mejor es secarla en un volumen grande y almacenarla en esa forma; Durante ese almacenamiento, la antitoxina alcanza su estado estable. Una vez que ello ocurre, el contenido del frasco se lleva a volumen; se hace una filtración por filtro Seitz para eliminar la turbidez y se ajusta el título por dilución al punto deseado. Entonces se distribuye en los recipientes finales y se liofiliza por segunda vez. De esa manera se obtiene un producto con un título definido, estable tres años por lo menos.—

5 - Proteínas y globulinas concentradas.-

Las proteínas se adaptan bien al secado por liofilización, y no sufren alteraciones durante el proceso y posterior almacenamiento (35) .-

Cuando se secan proteínas, junto con lípidos, tal es el caso de los sueros por ejemplo, la porosidad y fragilidad del material deshidratado, hace que los lípidos sean fácilmente extraíbles con solventes orgánicos, y al mismo tiempo la desnaturalización de las proteínas durante ese proceso es menor que cuando dicha extracción se hace con el producto al estado líquido.—

Debido a que los anticuerpos están contenidos en la fracción globulínica de los sueros inunes, se ha hecho una práctica corriente separar esa fracción, para reducir el volumen a ser inyectado, y la cantidad de proteínas extrañas, y evitar en esa forma las reacciones alérgicas (27).

Según Flosdorf E.W. estas fracciones globulínicas pueden secarse -- por liofilización, no habiendo pérdida de su actividad durante la desecación, con mantenimiento de su potencia durante el almacenamiento. Los sueros anti-ofídicos, que se alteran rápidamente al estado líquido, sobre todo en las zonas cálidas, se conservan muy bien en la forma indicada.--

Flosdorf E.W. (27) señala que estas globulinas concentradas se redissuelven lentamente, necesitando a veces hasta media hora, y a este respecto cita un trabajo de Lahiri D.C. (38), según el cual la baja solubilidad de las globulinas de los sueros inunes, sería debido a los lípidos que acompañan a las proteínas. Para salvar ese inconveniente, indica que las sales biliares (taurocolato y glicolato de sodio) mejoran la solubilidad del producto secado y no alteran ni precipitan las proteínas. Al suero anti-ofídico, previo ajuste del pH a 7,2 le agrega un gramo de taurocolato de sodio por litro. Luego de almacenarlo dos días a 0°C., el suero lo extrae con éter a 0°C. por agitación, y centrifuga obteniendo tres capas: una superior que es el exceso de éter; una intermedia que lleva los lípidos extraídos de color blanco; y la capa del fondo que lleva el suero claro. Esta última capa la separa y le elimina el éter por inyección de aire le añade un gramo de taurocolato de sodio por litro, la distribuye en recipientes y la seca por liofilización.--

Según Lahiri, esa extracción de los lípidos, en presencia de sales biliares, mejora la solubilidad del producto, no produce pérdida de potencia de los cuerpos inunes, y el material resulta seguro para el uso humano.--

6 - Complemento de cobayo .-

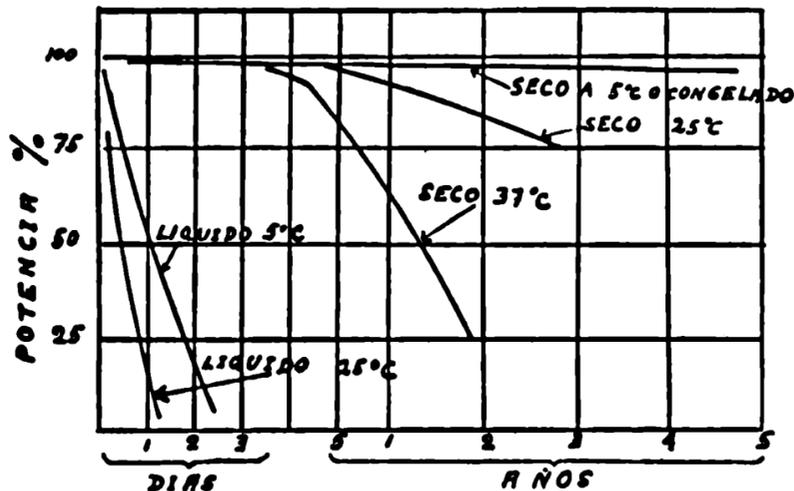
La conservación de la actividad complementaria del suero de cobayo liofilizado, es tal vez la mejor indicación del gran valor de éste método de desecación.--

La actividad del complemento de cobayo, que dura pocas horas al estado líquido, puede mantenerse hasta cinco años o más en el producto secado por liofilización.--

Reproduzco en el esquema XI un gráfico de los datos obtenidos por Flosdorf E.W., Hull L.V. y Mudd S. (19) de los ensayos realizados durante un período de cinco años.--

7 - Cepas para el cultivo de bacterias y virus.-

Las primeras investigaciones en éste campo, datan de 1909 en que --

ESQUEMA N° XII.-

DURACION DE LA POTENCIA DEL COMPLEMENTO
DE COBAYO

Se ve en el gráfico, que el complemento liofilizado mantenido a 52 centígrados conserva más del 90% de su actividad después de 5 años.-

Con respecto a la técnica de preparación y forma de secarlo, me he de referir en la parte experimental.-

Shakell L.F.(1) se refirió a la desecación del virus de la rabia.-

A partir de entonces, muchos investigadores se han ocupado de la conservación de los cultivos de microorganismos al estado congelado, y podemos decir que éste es el método que actualmente debe preferirse en la preservación de los stocks de cultivos.-

Swift H.F.(4), dice haber tenido éxito en la desecación de algunas cepas de microorganismos patógenos, tales como los neumococos y meningococos.-

Elser W.J., Thomas R.A. y Steffen G.I.(2) desecaron por liofilización cultivos de gonococos y meningococos suspendidos en suero sanguíneo inactivado, y después de un período de almacenamiento de 18 años, los cultivos fueron reintegrados. Considerando que estos microorganismos son sensibles al frío y a la desecación, esta supervivencia indica el valor del método. También tuvieron éxito en la conservación de fermentos, y realizaron ensayos con protozoarios y espiroquetas. Estos últimos los recobraron en muy pocos casos: efectuaron ensayos con la spirochaeta duttoni, el tripanosoma brucei y parásitos de la malaria, pero con resultados muy poco favorables, ya que dichos parásitos no sobrevivieron después de secados.-

Floedorf E.W.(27), cita a muchos investigadores que se han referido al mantenimiento de cepas para el cultivo de bacterias secadas por liofilización: Siler y sus colaboradores (39), ha mantenido cultivos de *Shigella* tífosa a la temperatura ambiente durante 10 años, que les sirvieron para realizar importantes investigaciones, que les permitieron la fabricación de una vacuna para la fiebre tifoidea.-

Welch H., Borman E.K. y Mickle F.L.(40) conservaron cultivos de *Klebsiella pneumoniae*.-

Floedorf E.W. y Kimball A.C.(41), mantuvieron durante 12 años el *H. pertussis*, con resultados excelentes.-

Appleman M.D. y Sears O.H.(42) señalaron que las bacterias de los nodulos de las raíces de las legumbres (*Rhizobium leguminosarum*), después de cuatro años de almacenamiento, retienen la propiedad de nodular en las plantas huéspedes, y de fijar el nitrógeno.-

También pueden secarse por liofilización, cultivos de hongos y bacterias para la industria lechera, para la producción de quesos, leches fermentadas, etc. En el caso de los hongos, generalmente son secados los esporos, en vez de las formas vegetativas.-

Para secar cultivos de microorganismos se utilizan equipos pequeños de laboratorio. Floedorf E.W.(27) describe uno de estos aparatos

Floedorf E.W. y Hudd S.(9), señalan que los recipientes más convenientes para la desecación de bacterias y virus, son tubos de vidrio de 95 mm. de largo por 7 mm. de diámetro. Estos tubos son estrechados para facilitar luego el cierre, y se llenan con pipetas capilares.-

Los recipientes deben ser esterilizados previamente; luego se colocan en ellos los cultivos y se congelan en la superficie haciéndolos rotar en un baño frío y finalmente se conectan al aparato con la bomba en marcha.-

Los cultivos deben ser sometidos a muy bajas temperaturas antes del comienzo del secado, y la unión de los recipientes debe ser rápida para evitar la descongelación.-

De los estudios efectuados, se ha encontrado que las proteínas aumentan el mantenimiento de las cualidades de los gérmenes y el porcentaje de supervivencia. Por eso a los medios de cultivos se les agrega plasma suero inactivados, o leche desnatada estéril (27).-

Cuando los gérmenes crecen en medios líquidos se centrifugan y luego se suspenden en leche desnatada estéril. Si se trata de un medio sólido, se suspenden en solución fisiológica y se les agrega un volumen igual de leche. Luego se distribuyen en los recipientes en cantidades muy pequeñas, (0,05ml. es suficiente) y se secan como se indicó.-

La desecación debe continuar hasta que el contenido de humedad sea

menos del 1%, y preferiblemente inferior a 0,5% .-

Como los microorganismos son muy sensibles a la humedad no conviene usar recipientes con tapones de goma, sino ampollas o tubos de vidrio que se cierran a la llama.-

Antes de cerrar los recipientes se evacúa totalmente el aire, o bien se reemplaza por nitrógeno puro. Más simple es cerrar al vacío y se corrige menos riesgo de contaminación.-

Durante el almacenamiento los cultivos conviene mantenerlos entre 5°C. y 8°C.-

Este método tiene gran aplicación para la conservación de stocks de cultivos. Los gérmenes conservan sus caracteres originales y se evitan -- los continuos subcultivos, y los cambios y mutaciones que ocurren en esos trasplantes .-

Ha sido de gran utilidad para preservar razas de *penicillium notatum* para la producción de penicilina.-

En cuanto al porcentaje de supervivencia, según Floedorf E.W. (27),- puede alcanzar hasta un 80 a un 90% .-

La espiroqueta pálida de la sífilis no resiste el secado por liofilización. Eagle y sus colaboradores (32), lo comprobaron tomando chancros de conejos sífilíticos que fueron emulsionados y secados. El material seco fué a su vez reemulsionado e inyectado intratesticularmente a conejos: dichos conejos no mostraron en ningún momento signos de sífilis.-

Conservación de virus:

Los virus son más difíciles de liofilizar que otros productos.-

Siendo de naturaleza tan lábil, se requieren temperaturas más bajas, debajo de -20°C., y dicha temperatura se mantiene hasta que la desecación sea lo más completa posible (9).-

Una vez secos, generalmente el vacío se reemplaza por nitrógeno purificado sobre cobre caliente.-

Existen muchos trabajos referentes a este tema. En efecto, Floedorf E.W. (27), cita que Siedentoph y Green (43) han conservado virus de las enfermedades del perro. El virus de la influenza, se conserva con todo éxito por liofilización, lo que se aplica en muchos laboratorios de investigación (44).-

Hoffstadt R.E. y Trippl H.B. (45), preservaron durante tres años varias razas de virus de enfermedades de aves y otros tipos.-

También se han conservado el virus del cólera del cerdo (46), el de la fiebre amarilla, el de la peste bovina, el del mosaico del tabaco, etc.

9 - Vacunas de bacterias y virus:

La liofilización resulta conveniente para la conservación de vacunas preparadas con bacterias vivas. Para vacunas preparadas con bacterias --

muertas la aglutinabilidad de los organismos celulares, ha sido señalado por Flosdorf E.W. (27), como un inconveniente para la conservación.-

El método ha sido aplicado para la conservación de vacunas bacterianas vivas de la brucella abortus, que se utilizan para el ganado. Los microorganismos se suspenden en suero o leche, se ajusta el PH entre 6,6 y 6,8 y se desecan. Durante la operación, la temperatura no debe elevarse -- por encima de la temperatura ambiente, ni debajo de la temperatura del -- hialo seco.-

Con una supervivencia del 50% de los gérmenes, se considera una buena vacuna, aunque se ha obtenido un 90% de viabilidad (27).-

También se han conservado con buenos resultados, la vacuna contra la fiebre amarilla del hombre, y vacunas para la profilaxis antivariólica, y algunas vacunas para la prevención de enfermedades en animales, como la peste del ganado y el cólera del cerdo.-

Con respecto a la vacuna contra el cólera del cerdo, Flosdorf E.W. (27) dice que Munce y Reichel (46) han llegado a la conclusión, de que esta vacuna que comúnmente no tiene una duración mayor de noventa días cuando se conserva con el agregado de 0,5% de fenol, puede mantener su actividad durante un período más largo cuando se seca por liofilización y se almacena en ampollas cerradas.-

10 - Antibióticos:

La penicilina, la estreptomisina y otros antibióticos, pueden secarse por liofilización con buenos resultados.-

Ahora bien: a partir de 1948, empezó a utilizarse la penicilina cristalina, de manera que actualmente no se requiere la liofilización en la obtención de este antibiótico, ya que económicamente no resultaría conveniente.-

Anteriormente, la penicilina amorfa fué secada por liofilización. Voy a referirme a algunas consideraciones señaladas por Flosdorf E.W. (19):-

Algunas propiedades relacionadas con la naturaleza de la penicilina hacen que sea un producto más difícil de liofilizar.-

Se trata de una substancia que dá soluciones que forman espuma abundante cuando se calientan. Cuando se seca por liofilización, hay que mantenerla a temperaturas bajas, no por su labilidad, sino por su naturaleza física: no se conserva congelada si no es entre -20 y -25°C. Si no se mantiene a esta temperatura, se produce el ablandamiento, con burbujeo y formación de espuma.-

La penicilina puede secarse a granel, o en los recipientes finales para su distribución.-

La desecación en volumen no encontró mucho apoyo, debido al problema del mantenimiento de la esterilidad al hacer la subdivisión del polvo en

las ampollas o frascos para su distribución. A esto hay que agregar, que la higroscopicidad de la penicilina seca, y la pesada exacta de pequeñas cantidades complicaba el problema. Debido a ello, se prefirió desecarla en los recipientes finales.-

En muchos casos la solución inicial se concentraba en volumen, y luego se transfería a los frasquitos, con lo cual se reducía el tamaño de los mismos.-

Otro inconveniente en el secado de la penicilina, es que como se trata de pequeños volúmenes, hay mucho riesgo de que el producto se ablande al pasarlo del baño congelante a las cámaras de secado. Para evitar esta dificultad, se utilizaron cámaras especiales que pueden ser enfriadas a la temperatura de sub-congelación, y luego se aumenta su temperatura haciendo circular un fluido caliente. Se carga la cámara con los frascos de penicilina, y se congela por enfriamiento y aplicación de vacío, lo que se consigue en media a una hora. Luego se prosigue el secado. El vapor de agua se elimina con eyectores de vapor, o sino con condensadores y bombas de vacío.-

En cuanto al grado de vacío requerido en el proceso, Flosdorf E.H. señala que una presión de 250 a 400 micrones es adecuada en el primer tiempo del secado, cuando se elimina la mayor parte del agua. En el segundo tiempo, para remover las trazas finales de humedad, se necesitan de 50 a 100 micrones.-

Para obtener un producto apropiado, la temperatura de la penicilina debe elevarse al final del secado, a temperaturas más altas, que pueden llegar aún hasta 110°C.-

La estabilidad de la penicilina depende del contenido de humedad. En Estados Unidos se requiere oficialmente que la humedad sea inferior a 2,5 % pero un porcentaje inferior a 0,5, es necesario para que tenga una máxima estabilidad.-

En cuanto al recipiente a utilizar, las ampollas de vidrio cerradas a la llama, serían lo mejor para preservar el producto, pero por razones de las ventajas para el uso clínico, se han preferido los frascos con tapones de caucho, a pesar de que así disminuye el tiempo que mantiene su potencia, debido a que el caucho es algo permeable a la humedad. (27).-

En la misma forma, la desecación por congelación puede aplicarse a la estreptomycin, bacitracina y otros antibióticos.-

11- Bacteriófagos:

Han sido secados por liofilización bacteriófagos de algunos organismos. Schade y Caroline(47), prepararon un bacteriófago de la disentería bacilar en forma estable.-

12- Tuberculina:

Tuberculinas para el control de la tuberculosis, se han secado con éxito por liofilización.-

Flosdorf E.W. (27) cita a Seibert y Du Four (48), diciendo que estos investigadores han encontrado que este material proteico cuyas propiedades se alteran al estado líquido, no sufren alteraciones una vez liofilizados.-

En la misma forma se ha conservado la vacuna BCG (48).-

13- Medios para cultivo de tejidos:

Suero, plasma y jugo de embrión liofilizados, constituyen excelentes medios para cultivo de tejidos, sobretudo para largos trabajos experimentales permiten utilizar medios de naturaleza constante, como ha sido establecido por Hetherington D.C. (49).-

14- Tromboplastina:

Por liofilización se han obtenido tromboplastinas estables, para la determinación del tiempo de protombina por el método Quick .-

15- Derivados sanguíneos:

Flosdorf E.W. (27), indica que células sanguíneas humanas secas, se utilizan para el tratamiento tópico de heridas, quemaduras y úlceras. Estos productos tendrían la propiedad de estimular el crecimiento y regeneración de los tejidos.-

Se utiliza sangre fresca citratada; se separa el plasma, y el residuo constituido por el estroma y células sanguíneas se liofiliza, obteniéndose un producto que es estable durante un tiempo.-

También señala que muestras de hemoglobina liofilizadas, han permanecido inalteradas durante cinco años. La hemoglobina en parte se transforma en metahemoglobina, pero en realidad el pigmento, no es alterado, ya que la metahemoglobina puede ser convertida nuevamente en hemoglobina por medio de hiposulfito de sodio.-

16- Bilis:

La bilis secada por liofilización, constituye un producto estable, que puede reconstituirse en determinado momento, para su uso en el tratamiento de ictericias obstructivas. (27).-

17- Aminoácidos:

Ciertos hidrolizados de proteínas y aminoácidos pueden secarse por liofilización.-

Flosdorf E.W. (27), señala por ejemplo, que hidrolizados de caseína, con agregado de aminoácidos, pueden ser conservados de esta manera para su

utilización en un momento oportuno.-

Al referirse al procedimiento de secado de estos productos, indica que las mezclas de aminoácidos son algo más difíciles de secar, debiéndose emplear temperaturas más bajas. Agrega que este inconveniente puede salvarse concentrando la solución de proteína hidrolizada a temperatura debajo de 50°C., y añadiendo luego dextrina. Después, este hidrolizado concentrado se congela y se deseca.-

Estos productos se utilizan en soluciones al 10% por vía parenteral. Tienen muchas indicaciones clínicas para el mantenimiento del balance del agua, prevención de edemas, como suministro de alimento en los post-operatorios, etc.-

18- Enzimas:

Muchas enzimas se han secado por el método de liofilización, sin pérdida de su actividad.-

Las enzimas de la leche (catalasas, oxidasas, peroxidasas) conservan su actividad como en la leche original, como se verá en la parte experimental.-

Dounce y Howland (50) han hecho estudios sobre las catalasas del hígado en materiales liofilizados, encontrando que dichas enzimas se mantienen como en el producto fresco.-

19- Hormonas:

En el comercio existen muchos productos hormonales, que han sido preparados por liofilización; se presentan como un polvo que se disuelve en el momento de su aplicación, con agua destilada.-

Tal es el caso de la gonadotrofina coriónica, proveniente de orina de mujeres embarazadas, o de orina de animales; de los extractos de lóbulo anterior y lóbulo posterior de hipófisis, etc.-

Otro ejemplo lo constituye la preparación del ACTH (hormona adrenocorticotrópica de origen hipofisiario), que se está aplicando en forma amplia en el tratamiento de la artritis reumatoidea y otras afecciones.-

Resumiendo, podemos decir que una gran variedad de tejidos glandulares triturados, pueden secarse por liofilización, con gran mantenimiento de sus propiedades.-

También se ha aplicado la liofilización para el estudio de los estereótipos en muestras de orina (23). Como estos compuestos químicos están en pequeña cantidad, es necesario concentrar la orina. El método común de secar, por destilación al vacío a alta temperatura, aparte de la formación de espuma abundante y otras dificultades, deja su duda sobre posibles cambios químicos que pudieran ocurrir en los componentes. Señalan los autog

res, que la concentración hecha por liofilización es muy conveniente para evitar la alteración química de tales constituyentes.-

20- Vitaminas:

Las vitaminas no sufren ninguna alteración en éste procedimiento de secado, y se conservan bien si se envasan con exclusión del aire.-

Las vitaminas solubles en agua, pueden secarse con buenos resultados. Estas soluciones acuosas son inestables. Por liofilización se obtienen polvos que mantienen su potencialidad en forma segura, y que tienen una gran solubilidad, lo cual es una gran ventaja en el momento de su uso.-

El complejo vitamínico B, para uso médico puede ser conservado por éste método con las ventajas señaladas.-

21- Drogas:

Chambers A.M. y Nelson W.J. (24) hicieron estudios con hojas de belladona, secadas en hornos a 50°C., y con las mismas secadas por liofilización.-

Recogieron hojas de "atropa belladona" opuestas, de la misma edad y tamaño, y que habían estado en las mismas condiciones atmosféricas, y las dividieron en dos lotes: uno lo secaron en hornos a 50°C. y a 65°C. y el otro fué liofilizado.-

Después del secado, las hojas las redujeron a polvo y efectuaron los análisis sacando las siguientes conclusiones:

- 1°) La liofilización reduce el contenido de humedad en un grado tan bajo como la desecación en horno a 50°C. durante 36 horas.-
- 2°) En la preservación de los alcaloides de la belladona, la liofilización es tan efectiva como la desecación en horno a 50°C.-
- 3°) En los extractos alcohólicos determinaron el nitrógeno total, el nitrógeno amínico y el nitrógeno amídico. Con respecto al N total y al N amínico, obtuvieron datos semejantes. En cambio, el N amídico resulta alrededor del doble en las hojas secadas en horno. Esto indicaría que en las muestras secadas en horno, habría tenido lugar alguna proteólisis, o que ésta es mayor que en las liofilizadas.-
- 4°) No fué encontrada ninguna diferencia en el contenido de almidón.-
- 5°) La liofilización preserva los azúcares comparada con la desecación en horno a 50°C.-
- 6°) La desecación en horno tiene un efecto destructivo sobre la clorófila mientras que la liofilización preserva este pigmento.-
- 7°) No hay evidencia que la proporción de hyosciamina a atropina, sea diferente en los dos métodos de desecación.-

Se puede decir entonces que la liofilización preserva ciertos constituyentes mejor que la desecación en horno a 50°C., y que es por lo tan-

to un método muy recomendable para la conservación de drogas, que merece ser estudiado.-

22- Muestras para la observación con el microscopio electrónico:

La liofilización ha sido preconizada por Wyckoff (51) para la preparación de muestras para estudios con el microscopio electrónico.-

Indica que la mayoría de las proteínas, sean cuando están en una suspensión molecular, o cuando forman parte de un tejido biológico organizado, están fuertemente hidratadas. Al eliminar esa agua por desecación al aire, dice que es probable que las partículas elementales de muchas proteínas se destruyan y se falseen los resultados.-

Como el agua debe eliminarse para la observación, es necesario tener técnicas para desecar que provoquen mínima alteración, lo que parece que es factible por medio de la liofilización.-

Para efectuar la preparación, se toma una microgota de la solución a estudiar, se aplica sobre una lámina o pantalla de colodion enfriada con hielo seco o aire líquido, y enseguida la lámina fría congelada es transferida rápidamente a la cámara de vacío y desecada.-

Wyckoff ha obtenido microfotografías de bacterias, de virus de plantas y animales y de tejidos. Dice que en muchos casos las fotografías son semejantes a las obtenidas con preparaciones secadas al aire, pero en otros, ha obtenido microfotografías sorprendentes.-

23- Secado de huesos:

La liofilización tiende a desplazar el proceso de conservación de huesos en líquidos a bajas temperaturas, o en cámaras de congelación, que han sido usados hasta ahora en los bancos de huesos.-

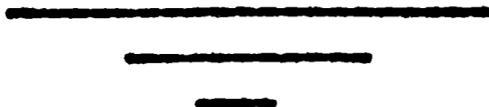
Floedorf E.W. señala que los huesos secados por liofilización son almacenados y distribuidos más fácilmente.-

El procedimiento consiste en congelar los huesos a -40°C . a -70°C ., formando un block de hielo alrededor, y luego desecarlos en cámaras a -40°C .. El hielo y el agua del hueso se eliminan.-

Se obtiene un material de estructura porosa, que fácilmente se reconstituye como un hueso normal, con el agregado de agua en el momento del uso.-

Se indica que las sales, las proteínas y otros constituyentes, no son redistribuidos, y que el hueso readquiere su capacidad circulatoria.

En EE.UU. existen bancos de huesos secados por liofilización.-



PRODUCTOS ALIMENTICIOS:

Aunque algunos alimentos como la leche y jugos de frutas, fueron secados por liofilización ya en 1935 (6), fué recién en 1945 que éste método comenzó a aplicarse satisfactoriamente en escala industrial, en la conservación de productos alimenticios (20) .-

1 - Jugos de frutas:

Los jugos de frutas secados por liofilización, una vez reconstituidos con agua, son muy semejantes a los productos originales.-

El material que se obtiene, es fácilmente soluble en agua, originando un jugo con un sabor y olor casi igual al de los jugos frescos. Los componentes lábiles, como la vitamina C, no son afectados mayormente durante la desecación y período de almacenamiento.-

La calidad del producto obtenido, nunca es mejor que la del material del cual se partió, pero el método permite estabilizar dichos productos.-

La liofilización se ha aplicado en E.E.UU. en la desecación de jugos de naranja, de limón, de guayaba, de ananá, etc., permitiendo su distribución en zonas donde no es posible enviar frutas frescas.-

Procedimiento de secado:

En algunos casos suele agregarse a los jugos estabilizadores, como gelatina y también azúcar.-

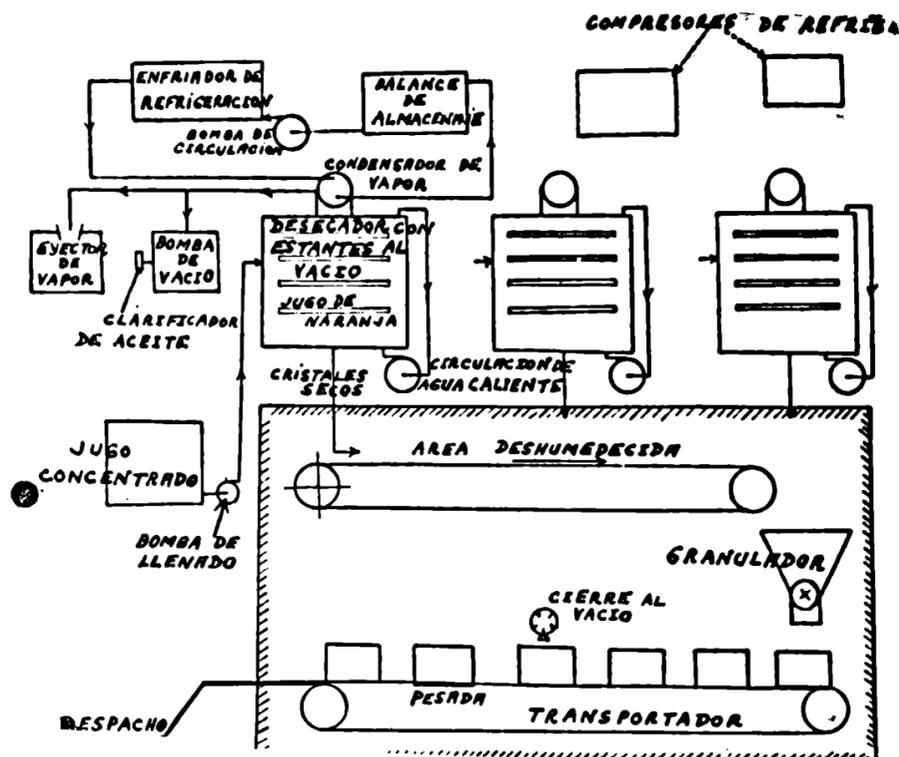
El proceso se realiza en plantas que permiten una operación continua. (Ver Esquema nº XI)

A veces los jugos son concentrados primeramente, para tener mayor rendimiento. sometiendo el producto a un enfriamiento lento, se originan cristales, que luego se separan por centrifugación, obteniéndose así concentrados de buena calidad (27).-

Otras veces, al jugo concentrado se le agrega una porción de jugo fresco, con lo cual se proporcionan constituyentes aromáticos volátiles, que mejoran la calidad del concentrado y por lo tanto la del producto final que se obtiene.-

El jugo concentrado es dirigido por una tubería a los estantes de las cámaras de secado; enfriando la cámara y efectuando una desgasificación preliminar aplicando vacío, se consigue congelarlo.-

Una vez congelado el producto, se elimina el agua por sublimación para lo cual se utilizan condensadores enfriados y bombas rotatorias de aceite para producir el grado de vacío necesario. También pueden utilizarse eyectores de vapor, cuando la cantidad de agua a eliminar es muy grande.-

ESQUEMA N° XI.-**Planta de desecación de jugo de naranja (de Flosdorf E.W.-20-)**

A medida que el proceso prosigue, cuando es necesario aumentar la temperatura de las cámaras, se hace circular por ellas agua caliente.-

El material una vez secado se descarga de las cámaras, y en un ambiente libre de humedad se homogeneiza, se envasa en recipientes apropiados (latas o tarros) y se cierran al vacío o bajo un gas inerte.-

El contenido de humedad se reduce debajo del 2%, por lo general alrededor del 0,5%. El producto obtenido es blando, suave, fácilmente soluble en agua, originando jugos de sabor y de olor agradables. Bien envasado, con un contenido de humedad menor del 1%, la vitamina C conserva gran parte de su actividad durante más de un año, como se verá en la parte experimental.-

2 - Leche:

La leche de vaca puede ser secada por liofilización, dando un polvo de la mejor calidad.-

En E.E.UU. se aplica en la obtención de polvo de leche de cabra. - Flosdorf E.W.(20), señala que el olor fuerte que tiene la leche de cabra fresca, desaparece en la leche desecada, originando un producto con un -

gusto semejante al de la leche de vaca, que puede ser utilizada por las personas alérgicas a ésta última.-

El polvo de leche liofilizada es altamente soluble. Sus componentes como las proteínas, azúcares, enzimas y vitaminas, no son alterados. Las grasas no se alteran en el proceso del secado, pero se oxidan durante el almacenamiento, si el oxígeno no es completamente eliminado.-

El número bacteriológico no varía con la desecación, ya que los gérmenes no son muertos durante el proceso, ni tampoco se multiplican durante el almacenamiento debido al bajo contenido de humedad (20).-

El procedimiento puede ser muy útil para la reserva de la leche humana, en los puntos donde puedan establecerse bancos de éste tipo de leche.-

3 - Carnes:

Se han obtenido resultados muy satisfactorios en la desecación de carnes por liofilización.-

Como con cualquier producto, la carne cruda es congelada en cámaras y luego el hielo es sublimado bajo alto vacío por medio de bombas y condensadores.-

Floedorf E.W. (27), señala las siguientes características en las carnes liofilizadas:

El producto secado, una vez reconstituido con agua, se parece al producto original en su forma y tamaño y aún en el color.-

Las proteínas no sufren cambios químicos inmunológicos ni antigénicos.-

Las grasas no experimentan cambios químicos durante el secado, pero pueden cambiar su estado de dispersión coloidal. Pueden oxidarse, pero efectuando un buen cierre al vacío o con un gas inerte, no es ningún problema. Tampoco sufren hidrólisis si el producto es bien secado.-

Debido al bajo contenido de humedad, en las carnes liofilizadas, es muy difícil que ocurran cambios enzimáticos o crecimiento bacteriológico.-

El contenido de vitaminas es preservado sin pérdida de actividad y las carnes una vez reconstituidas son indistinguibles de la carne fresca en su sabor.-

Floedorf E.W. (27), señala que a una temperatura de 37,5°C. las carnes secadas no sufren deterioración en un período de 18 meses. A una temperatura de 5°C., posiblemente se mantengan indefinidamente.-

El contenido de humedad no debe ser mayor del 2%. En esta forma las carnes pueden mantenerse sin refrigeración durante meses y aún años sin ningún peligro de alteración y contaminación bacteriológica, siem-

pre que están perfectamente envasadas.-

4 - Filet de pescados, almejas, ostras:

Estos productos, que se alteran fácilmente, aún a bajas temperaturas como 5°C., son conservados por liofilización con todo éxito (20) y (21)

Las ostras y almejas se secan peladas generalmente. Después de su reconstitución estos alimentos retoman su forma original en forma sorprendente.-

5 - Café y té :

Los extractos de café secados por liofilización, son superiores a los polvos obtenidos por cualquier otro método.-

El producto que se obtiene es muy soluble en agua, y los componentes aromáticos son perfectamente retenidos.-

En la misma forma pueden prepararse extractos de té.-

6 - Vegetales:

Zanahorias, guisantes, jugos de tomates, y otros vegetales, pueden secarse por liofilización dando productos excelentes, que se reconstituyen en pocos minutos, con un sabor semejante al de los primitivos alimentos.-

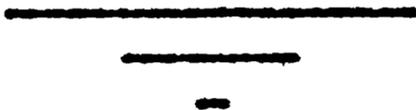
Con estas sustancias, debido a su bajo precio, el costo de la operación no justifica la aplicación del método, salvo para algún propósito especial.-

Conclusión:

Podemos decir que la liofilización es un método excelente para la conservación de alimentos. El costo de la operación, hace que el mismo - en muchos casos no pueda reemplazar a otros métodos corrientes, que son menos costosos, pero que no resultan tan eficaces.-

Tiene amplia ventaja sobre cualquier otro procedimiento, porque -- los alimentos conservan los caracteres organolépticos, sus constituyentes y casi todas sus propiedades inalteradas, y porque es posible mantenerlos sin refrigeración durante un tiempo prudencial.-

Esto hace que sean insustituibles para ciertas situaciones especiales, como casos de guerra, expediciones, envío de alimentos a zonas apartadas, etc.-



V - ESTUDIO EXPERIMENTAL -

V - ESTUDIO EXPERIMENTAL -

La liofilización es una operación simple, que puede ser realizada fácilmente con fines experimentales.-

Basta contar con una buena bomba de vacío y un manómetro para medir bajas presiones. El resto del equipo puede variar, y se puede armar con materiales que se encuentran disponibles en cualquier laboratorio.-

Debe disponerse también de hielo seco y de un solvente como alcohol, acetona u otro conveniente, para formar mezclas que permitan producir bajas temperaturas con la nieve carbónica.-

Congelación inicial de los productos.-

Para realizar esta operación, fué utilizado un baño con mezcla de hielo seco y acetona.-

En un vaso de tamaño conveniente, en relación con los recipientes que se han de utilizar en el secado, se coloca acetona hasta la mitad, y se van agregando trozos de hielo seco. De esa manera se obtiene una temperatura de alrededor de -57°C ., que permite realizar fácilmente la congelación.-

Para ello el material a dessecar se dispone en los recipientes, que pueden ser ampollas o frascos, en cantidades que ocupan un tercio o la mitad de su volumen total como máximo, y luego se sumergen en el baño congelante, haciéndolos rotar para que el material quede formando una capa delgada en las paredes, con el objeto de obtener una mayor superficie de evaporación.-

Los recipientes deben mantenerse en el baño un tiempo conveniente, para que el material congele totalmente, formando una capa dura perfectamente adherida. Este tiempo depende del material que se ha de liofilizar, pero por lo general 20 minutos a una hora, es suficiente.-

1 - DESCRIPCIÓN DE LOS APARATOS UTILIZADOS.-

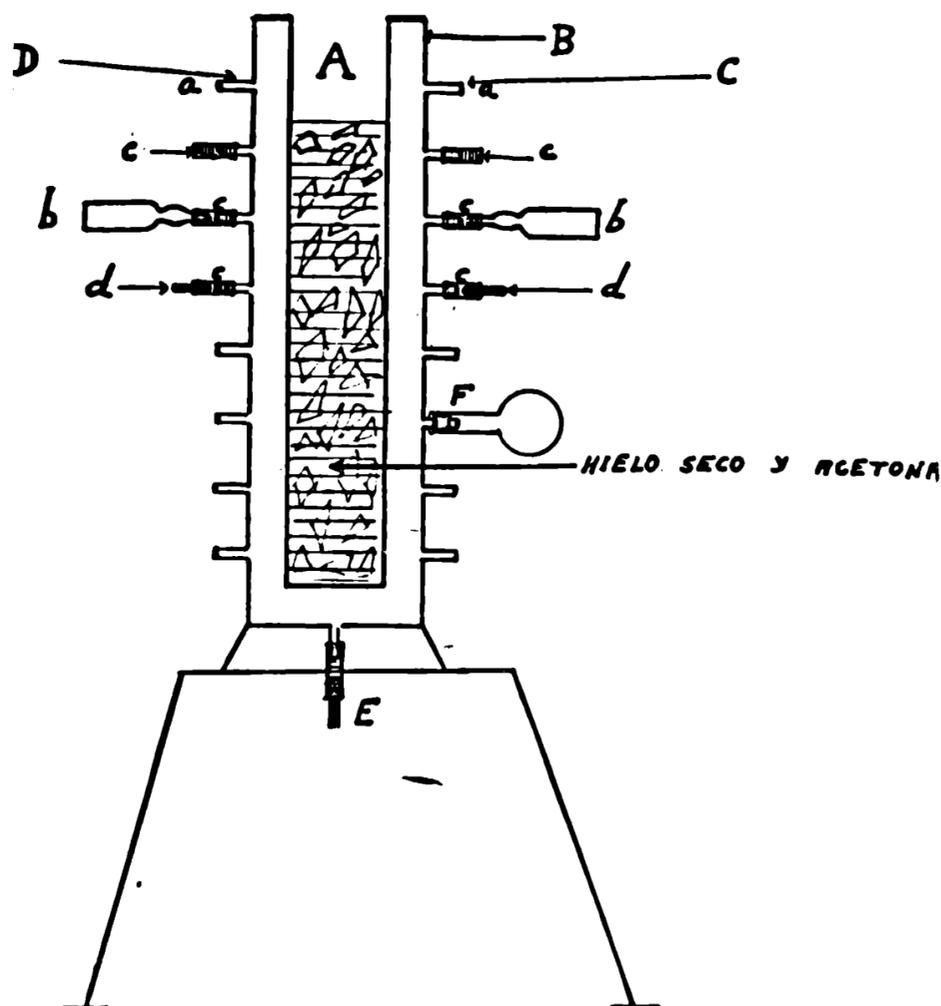
Muchos son los dispositivos que se han utilizado para liofilizar cantidades pequeñas de materiales, con fines experimentales.-

Voy a describir a continuación cuatro equipos que fueron ensayados durante la realización de este trabajo.-

-: Equipo nº 1 :-

Fue utilizado un aparato semejante al de Wyckoff y Lagsdin (30).-

ESQUEMA Nº XII:-



Equipo nº 1 - referencias ...:

Sección del tubo metálico central A: 4,5 cm. Altura del mismo: 48,5 cm.

Sección del tubo metálico exterior B: 8 cm. Altura del mismo: 52 cm.

Sección del cuello de las ampollas b: 7 mm.

Sección de los tubitos metálicos a: 8 mm.

Temperatura del condensador: -57,2 C.

Consta de dos cilindros concéntricos de metal, que están aislados por una capa de aire o por el vacío durante la operación.-

El cilindro central A, es abierto por su parte superior, y actúa

como condensador, para lo cual se carga con un solvente orgánico como acetona, alcohol, éter, etc., y trozos de hielo seco.-

El cilindro exterior B, tiene alrededor de toda su superficie pequeños tubos del mismo material a, que ponen en comunicación la luz entre los dos cilindros y el exterior.-

A cada una de estas salidas es posible conectar una ampolla b o recipiente con el material a desecar, por intermedio de un trozo de goma de vacío c.-

En el comienzo de la operación, antes de la unión de las ampollas con el material a desecar, o cuando a una salida no se la quiere utilizar, se la cierra conectando en el extremo de la goma una ampolla vacía, o un tubo de vidrio d cerrado en un extremo.-

Por uno de los tubos c se conecta la bomba de vacío, y por el otro d se une al manómetro McLeod.-

El tubo de la parte inferior e, sirve para sacar el agua condensada, después de la operación.-

En las uniones de la goma con los tubos de salida, es necesario colocar un lubricante, que puede ser glicerina, vaselina líquida, aceite de castor, o una solución de goma laca en alcohol, para prevenir la filtración de aire en el sistema.-

Este aparato tiene 42 tubos de salida, de manera que permite desecar 40 ampollas con materiales diversos, ya que las otras dos salidas se unen a la bomba de vacío y al manómetro.-

También pueden adaptarse al mismo, baloncitos o frascos, para lo cual basta tomar un tapón de goma que ajuste con la boca del recipiente, perforarlo y colocarlo en uno de los tubos de salida f.-

Al unir los recipientes, conviene lubricar el cuello con alguna de las sustancias enumeradas, para facilitar la conexión y evitar la filtración de aire.-

Bomba de vacío.-

Fue utilizada una bomba Duo-Seal Welch con las siguientes características:

Vacío garantido: hasta 0,0001 mm. de Hg. o sea 0,1 de micrón.-

Velocidad óptima de operación: 450 a 475 revoluciones por minuto.

Se trata de una bomba rotatoria de paletas con buena capacidad de absorción.-

Tiene asociada una bomba de difusión de aceite, que puede trabajar en combinación con la bomba rotatoria, para la obtención de muy alto vacío.-

Durante las experiencias no fue necesario utilizar la bomba difuso-

ra, por cuanto la bomba rotatoria produce el grado de vacío óptimo que puede necesitarse para liofilizar, que como máximo puede llegar a ser de 50 a 100 micrones.-

Manómetro.-

Fue utilizado un manómetro tipo McLeod, que son los que más se prestan para el proceso de liofilización.-

El principio en que se basan, y la descripción de los mismos fue hecha en el Capítulo III.-

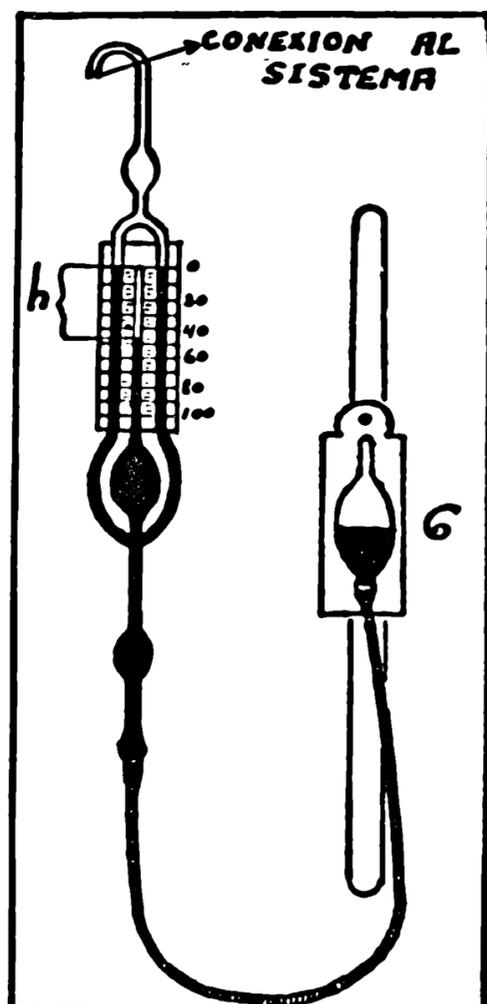
El tipo utilizado se ilustra en el Esquema N° XIII. Para efectuar la lectura basta levantar G, hasta que el nivel del mercurio alcance el 0 de la escala. La diferencia de nivel del mercurio entre el capilar central y los capilares laterales, leída sobre la escala da directamente la presión en micrones, aplicando la siguiente tabla:

$$\frac{h \times h}{1000} = P \text{ en mm. de Hg.}$$

Por ejemplo: h es igual a 10:

$$\frac{10 \times 10}{1000} = 0,1 \text{ mm. de Hg. (o sea 100 micrones).-}$$

ESQUEMA N° XIII.-



Esquema del manómetro utilizado

Recipientes .-

Para este tipo de aparato fueron utilizadas ampollas de vidrio de 20 ml. de capacidad.-

A las ampollas se les corta el cuello, y luego se alisa el borde del corte a la llama, para evitar que rompan las gomas al efectuar las conexiones.-

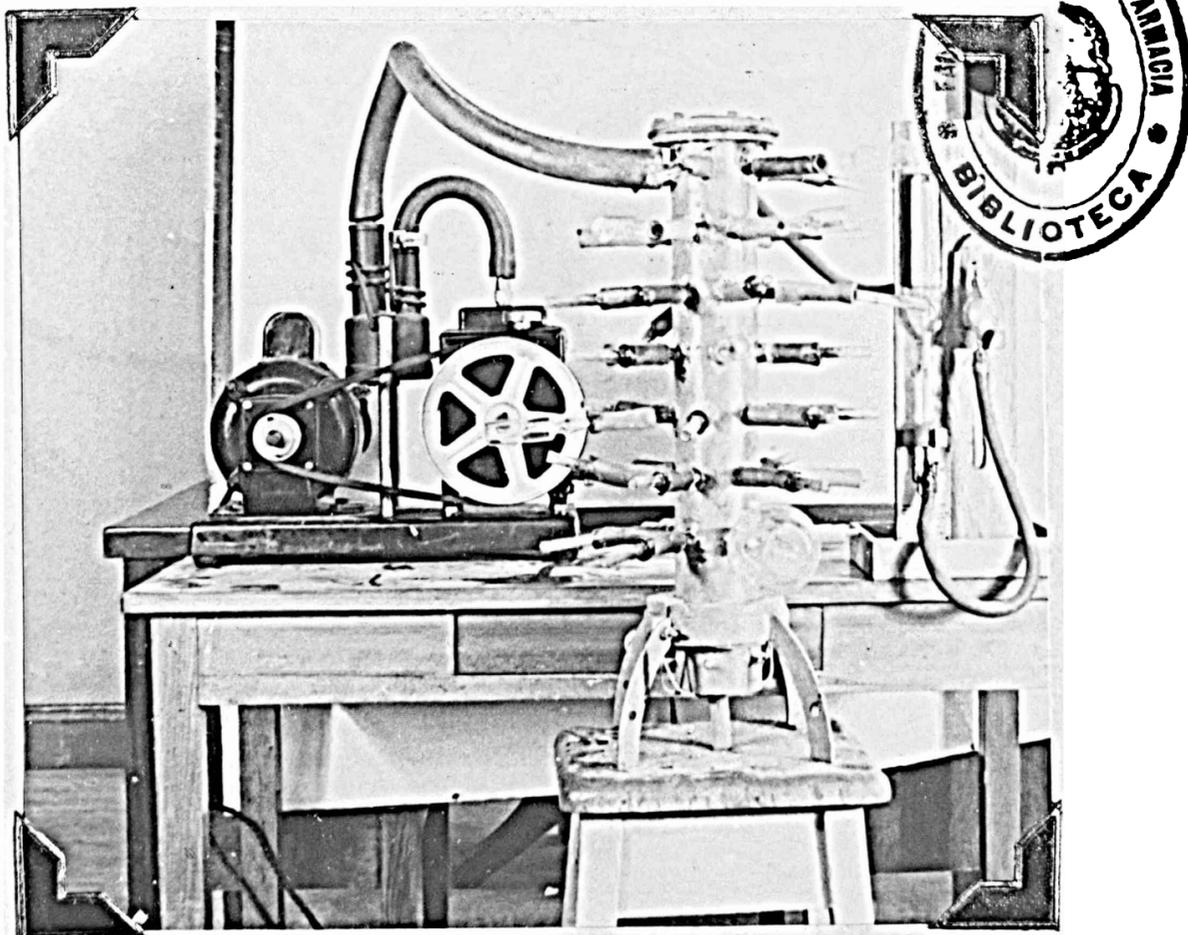
Con ampollas de esta capacidad se pueden desecar líquidos en cantidades hasta de 10 ml., vale decir que el material puede ocupar como máximo la mitad del volumen total del recipiente.-

Para volúmenes mayores se pueden utilizar ampollas de mayor tamaño, o sino balones o recipientes de vidrio similares, de 250 a 500 ml. de capacidad, con los cuales pueden secarse de 100 a 250 ml. de líquido. En este caso no pueden conectarse muchos recipientes, porque la superficie de condensación no sería suficiente y se produciría el deshielo del material.

Se presta muy bien el secado en ampollas, para realizar experiencias que requieren pequeñas cantidades de muestras, para efectuar ensayos periódicos.-

Marcha de la operación.

Primeramente es necesario poner el aparato en condiciones de trabajo, para lo cual una vez armado como se ve en la fotografía del mismo, se hace funcionar la bomba de vacío.-



-. Fotografía del equipo nº 1 .-

Se efectúa el registro manométrico de la presión, que debe ser por lo menos de 100 micrones en el comienzo de la operación. Si no se alcan-

para dicha presión, indicaría que hay filtración de aire en el sistema, lo cual debe repararse, porque sino el material se descongela, no siendo posible liofilizar.-

Se vierte acetona u otro solvente en el cilindro central A, hasta la mitad o más, y se agregan trozos de hielo seco de manera que el volumen de la mezcla alcance hasta la parte superior del cilindro. En estas condiciones en el condensador se puede originar una temperatura tan baja, como alrededor de -57°C ., pero se sabe que una temperatura de -40°C . es suficiente. Debe vigilarse durante toda la operación la temperatura del condensador, añadiendo hielo seco cuando sea necesario, para evitar que la misma pueda elevarse mas allá del límite indispensable.-

Se colocan los materiales a desecar en las ampollas o recipientes, en un volumen tal que alcance un tercio o la mitad de la capacidad de los mismos, y se los introduce en un recipiente con hielo seco y acetona. Imprimiendo un movimiento de rotación, es posible congelar los líquidos en forma de una capa delgada y uniforme en la periferia de las ampollas o frascos. Se los deja dentro del baño congelante 20 minutos a 1 hora, de modo que haya una congelación total y perfecta.-

Estando el aparato con la bomba de vacío en funcionamiento, se pinza la goma e, se quita el tubo d que obtura la misma, y rápidamente se conecta la ampolla con el material congelado. Se quita la pinza y se restablece la presión. De esta manera, se van uniando con pequeños intervalos, todas las ampollas con el material que se quiere desecar.-

Como consecuencia del vacío establecido y de la diferencia de presión de vapor del hielo en el producto congelado y en la superficie del condensador, se produce la sublimación del agua, desde las ampollas al condensador.-

Al comienzo de la operación, para evitar que el material se descongele, pueden aislarse los recipientes del efecto de la temperatura ambiente con un trozo de género. Corrientemente, si la operación marcha bien, se forma en la superficie de los recipientes una capa de hielo, por congelación de la humedad ambiente. Pasado un tiempo prudencial, conviene separar esa capa de hielo con el objeto de acelerar el secado, ya que la misma actúa como medio aislante del efecto de la temperatura ambiente.-

Al final del secado, puede aumentarse la temperatura, como hemos visto en el Capítulo II. En mis experiencias no limité nada más que a separar esa capa de hielo, haciendo que el material liofilice a la temperatura ambiente.-

Se trabajó en casi todos los casos a una presión inicial de 250 micrones, y luego, una vez conectadas todas las ampollas, la misma descien-

de, alcanzando a alrededor de 100 a 120 micrones, grado de vacío que se mantiene durante todo el proceso, y que es suficiente para eliminar las últimas trazas de humedad en la etapa final de la operación.-

Cierre de los recipientes:

Para asegurar la conservación de los materiales que se desecan, es necesario excluir el aire de los recipientes, efectuando el cierre al vacío, o reemplazándolo por una gas inerte como el nitrógeno.-

Cerrar las ampollas al vacío es una operación algo difícil, porque cuando se ablanda el vidrio, tiende a deformarse inmediatamente impidiendo el cierre. Ahora bien: si se estrecha el cuello de las ampollas previamente, la operación se realiza fácilmente con la llama de un buen mechero.-

Terminado el secado se sacan las ampollas, se estrecha el cuello a la llama, y se vuelven a conectar para excluir el aire. Cuando esto ocurre, sin sacarlas, se cierran con la llama en la parte estrechada sin ninguna dificultad.-

Tratándose de frascos o balones, conviene colocarles una tapa de goma, que pueda ser atravesada por una aguja, y ajustar la misma efectuando un cierre hermético. Luego, con un dispositivo constituido por el cuerpo de una jeringa hipodérmica y una aguja, que se conecta a la goma de la bomba de vacío, se excluye el aire del interior de los recipientes. Finalmente los bordes de la boca del frasco y la tapa, conviene parafinarlos.-

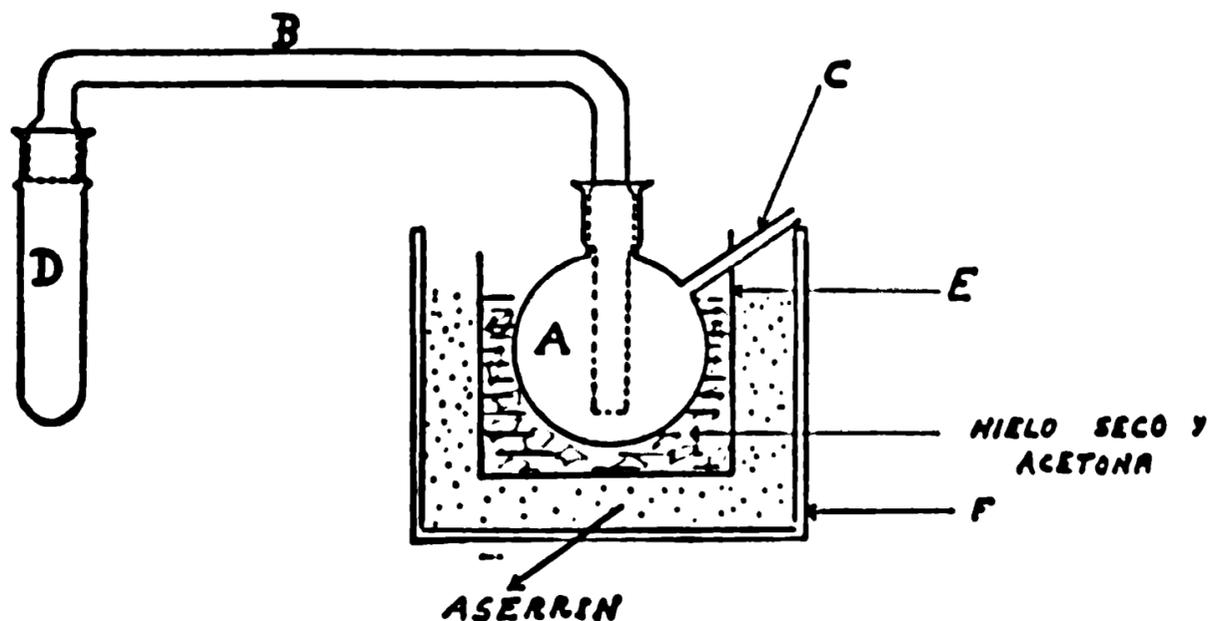
- Equipo nº 2 -

Christensen Royal L. (14), ha descrito un aparato simple para liofilizar pequeñas cantidades de material.-

Basado en el mismo se construyó uno semejante cuyas características se aprecian en el esquema nº XIV.-

A es el condensador; es un frasco de vidrio de cuello corto de 1 litro de capacidad, provisto de una unión de vidrio esmerilado, que ajusta perfectamente con la junta correspondiente del tubo de conexión B. Está provista de un tubo lateral C, por el cual se hace la conexión con la bomba de vacío. En el aparato de Christensen R.L., este tubo va provisto de una llave de tres vías para aislar el sistema, que fue suprimida para facilitar la construcción.-

B es el tubo de conexión entre el condensador y el vaso D, que contiene el material a ser secado. Es de vidrio pírax con un diámetro inter

ESQUEMA Nº XIV .-- Equipo nº 2 .-

no de 15 mm., doblado en ángulo recto en cada extremo, y provisto de dos uniones de vidrio esmerilado, que ajustan perfectamente con el condensador A, y con el vaso D. El extremo que penetra en el condensador llega a 3,5 cm. del fondo del mismo.-

D es un recipiente de vidrio pírrex, de boca esmerilada, de 2 cm. de diámetro por 15 cm. de largo, y en el cual se coloca el material a desecar.-

E es un recipiente de metal que contiene la mezcla congelante de hielo seco y un solvente orgánico, y él a su vez va dentro de una caja de madera F, con aserrín u otro material aislante.-

Cuando se desea liofilizar, se coloca en el recipiente E hielo seco y acetona o alcohol. En el vaso D se pone el material a desecar, y se congela haciéndolo rotar en un baño congelante, -de modo que la capa de material congelado resulte tan delgada como sea posible. Entonces se arma el aparato como indica el esquema y se hace funcionar la bomba de vacío.-

Conviene colocar un lubricante en las juntas, para obtener un cierre hermético.- No es necesario colocar ninguna trampa entre la bomba de vacío y el condensador porque éste retiene toda la humedad que pudiera pasar.-

En vez del recipiente D, se pueden utilizar otros tipos (frascos, balones, etc.), basta que tengan una unión esmerilada que ajuste perfectamente con la extremidad del tubo de conexión B .-

Si se quiere acelerar la desecación en el segundo tiempo, basta su-

mergir el frasco D en un baño con agua caliente a 30 a 40°C., teniendo cuidado siempre de no provocar la fusión del material congelado.--

No es posible dar datos exactos sobre la velocidad de liofilización ya que como hemos visto, depende de muchos factores.--

Trabajando con el recipiente D, a una presión de 120 micrones y a la temperatura ambiente, cantidades de 10cm³ de suero sanguíneo, y de 10 cm³ de leche en otros ensayos, fueron desecados en un tiempo de alrededor de una hora.--

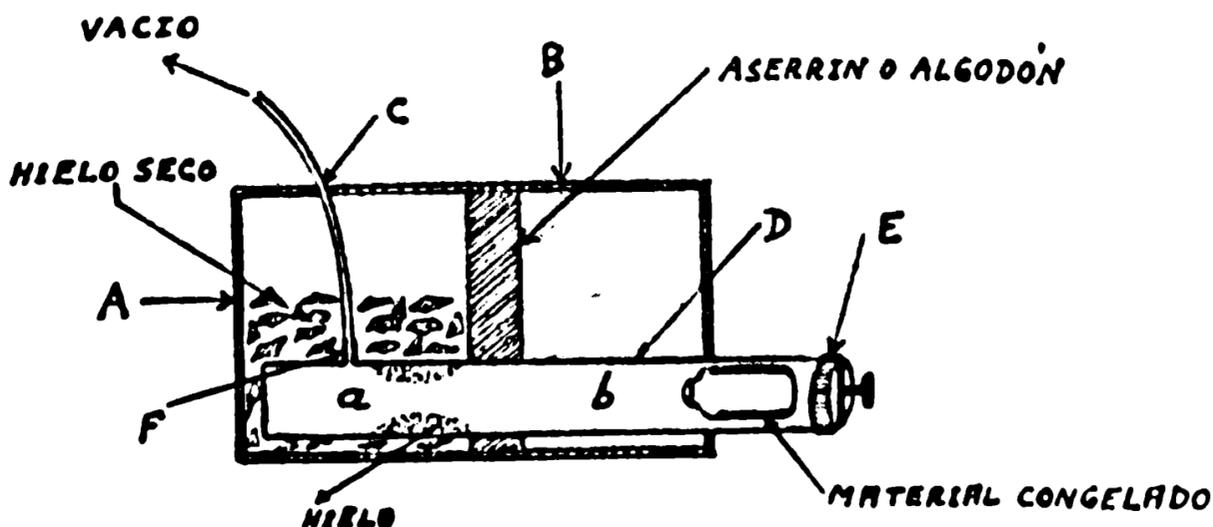
Christensen R.L. con frascos de 600 ml. de capacidad observó una velocidad de desecación de alrededor de 15 a 20 cm³ por hora trabajando con suero sanguíneo.--

-. Equipo n° 3 .-

Se hizo construir, y fué ensayado un aparato cuyas características son semejantes al descrito por Seegers W.(17).--

Consta de una caja de madera A que está provista de una tapa B, la que tiene un orificio C por el cual penetra la goma por donde se ha de efectuar la aspiración con la bomba de vacío.--(Esquema n° XV).--

ESQUEMA N° XV .-



Equipo n° 3 .-

En la parte inferior de la caja va un tubo de paredes metálicas D. Uno de los extremos del mismo sobresale de la caja de madera, y lleva una tapa E provista interiormente de una guarnición de goma, que permite asegurar un cierre hermético, por el ajuste de un tornillo. En el otro extremo lleva un tubo de salida F para la conexión con la bomba de

vacío.-

Por medio de un material aislante, como aserrín o algodón, se divide la caja en dos partes, y en la zona de la izquierda se coloca hielo seco machacado humedecido con un solvente orgánico.-

De esa manera la parte a del tubo actúa como condensador, mientras que en otro extremo b se ha de colocar el material congelado.-

Este aparato tiene la ventaja de que en él se puede liofilizar hasta un volumen de 200 ml. en varios tipos de recipientes, como erlenmeyers, frascos, vasos de precipitados, cápsulas, etc.-

Operación:

El material a desecar se coloca en el recipiente elegido y se congela de la manera indicada. Se abre la tapa E, y se introduce en el tubo, cerrando inmediatamente y haciendo funcionar la bomba de vacío.-

De esta manera, el agua sublima del material que se está secando, y el vapor de agua va a condensarse en la zona a del tubo metálico.-

Este aparato tiene el inconveniente de que es dificultoso vigilar la marcha de la operación. Para ello es necesario sacar la tapa E cada vez que se quiere ver en qué estado se encuentra el material, lo cual puede provocar la descongelación si no se hace con rapidez.-

Para conservar el material, una vez desecado, se asegura a los frascos un cierre hermético con tapas de goma, y luego se elimina el aire en la forma indicada.-

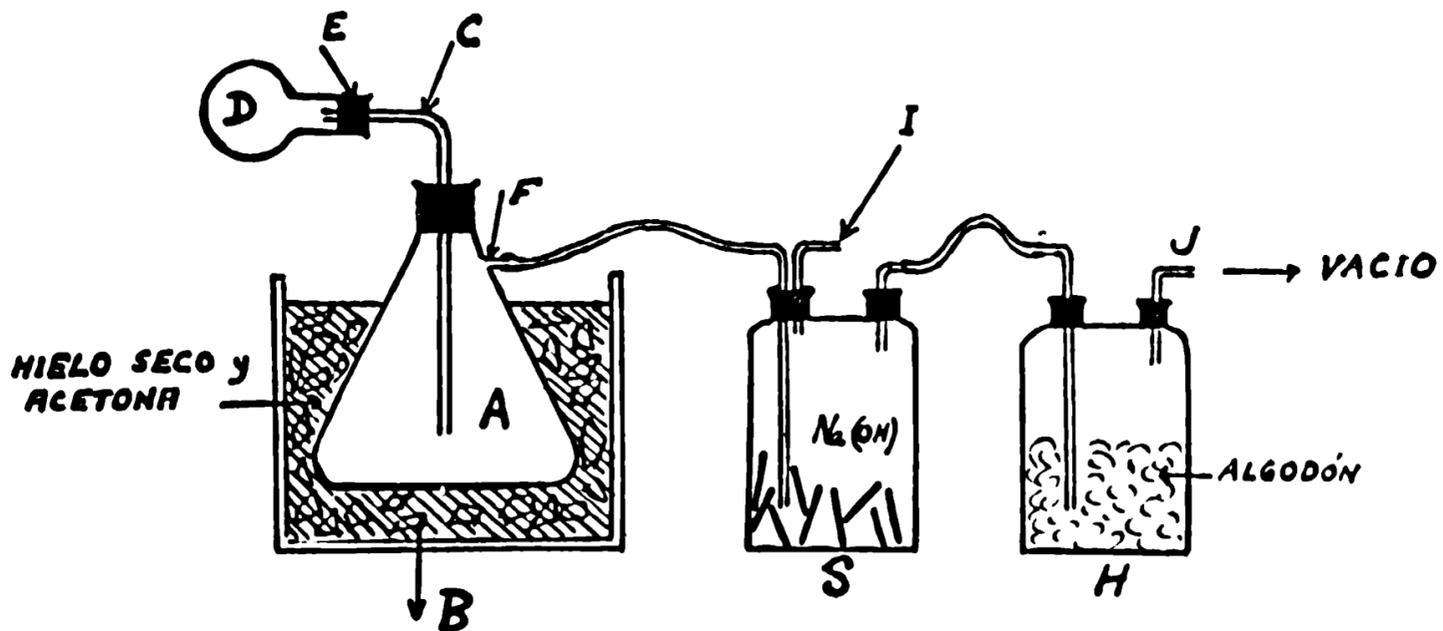
- Equipo nº 4 -

Con poco material y en forma sencilla es posible armar un dispositivo para liofilizar pequeñas cantidades de sustancias con fines experimentales, como el que se ilustra en el Esquema nº XVI.-

El condensador está constituido por un frasco kitasato de dos litros de capacidad A, que va sumergido dentro de un recipiente B que puede ser de vidrio o de cualquier otro material, como latón o cinc, y en el cual se colocan trozos de hielo seco y acetona. Sobre la superficie de la nieve carbónica conviene colocar algodón para que se conserve mejor.-

El recipiente B debe ser aislado del medio ambiente para facilitar la conservación de la mezcla frigerífica.-

El tubo C sirve de conexión entre el condensador A y el recipiente D, que contiene el material a desecar, que puede ser un balón o cualquier otro tipo de frasco que soporte el vacío. En el extremo superior del mismo, va insertado un tapón de goma E, que ajusta perfectamente con

ESQUEMA N° XVI.-Equipo n° 4

la boca del recipiente. Este tubo debe ser de un diámetro lo más grande posible.-

Por F se hace la aspiración. Los frascos S y H son nada más que protectores de la bomba de vacío, y pueden intercambiarse en cualquiera de los equipos enumerados.- El primero lleva hidróxido de sodio en barras y el segundo un trozo de algodón envuelto en una gasa. En esta forma se retienen los vestigios de humedad que pudieran escapar del condensador.-

En I se conecta el manómetro McLeod, y en J la bomba de vacío.-

Operación:

Primeramente debe verificarse que no haya ninguna pérdida en el equipo, para lo cual se arma como lo indica el esquema con el recipiente D vacío, y haciendo funcionar la bomba se registra la presión. Si marcha en perfectas condiciones, se para la bomba, se quita el frasco D, se coloca en él el material a desecar y se congela en la superficie del mismo haciendo rotar en un baño con nieve carbónica y un solvente orgánico.-

Una vez que el material está sólidamente congelado, rápidamente se une el recipiente al aparato, poniendo inmediatamente en funcionamiento la bomba de vacío.-

El vapor de agua que sublima del producto congelado se condensa en

Trabajando a una presión de 100-120 micrones, y estando el recipiente D a la temperatura ambiente, es posible liofilizar a una velocidad de 20 ml. por hora aproximadamente.-

El equipo nº 1 fué elegido para desecar pequeñas cantidades de materiales en ampollas, para poder disponer de varias muestras de la misma sustancia, que liofilizadas todas juntas, pudieran ser ensayadas en períodos de tiempo variable.- Por otra parte, el uso de ampollas cerradas a la llama, con exclusión del aire, es el mejor tipo de recipiente para la conservación de materiales liofilizados.-

El equipo nº 2, sólo permite desecar una sola muestra de volumen pequeño, en un tipo de recipiente como el ilustrado D. Para conservar varias muestras, es necesario disponer de varios recipientes de boca esmerilada, y efectuar una operación en cada uno de ellos, lo que no resulta práctico. Disponiendo de frascos de boca esmerilada de mayor volumen, puede servir para liofilizar cantidades mayores de líquidos.-

El equipo nº 3, dado el inconveniente para poder vigilar la operación, no resulta muy práctico su uso.-

El equipo nº 4, es práctico y permite desecar muestras de material en cualquier tipo de recipiente que soporte el vacío, en volúmenes de hasta 250 ml.-

2 - EXPERIENCIAS REALIZADAS .-

VELOCIDAD DE DESECACION .-

Como hemos visto en el capítulo II, son muchos los factores que intervienen en la velocidad de desecación en el método de secado por liofilización.-

Entre estos factores se encuentran los siguientes:

La forma como es congelado el producto: generalmente debe preferirse la congelación efectuada en las paredes del recipiente en forma de anillo, para tener una mayor superficie de evaporación, con lo cual se consigue acelerar la velocidad de desecación.-

La naturaleza del producto secado: los productos que tienen al final una estructura porosa, como en el caso del suero y plasma sanguíneos, leche, albúmina de huevo, la velocidad de desecación es más rápida. En cambio al jugo de naranja, es más difícil de quitarle el agua, porque en la parte final de la operación toma el aspecto de una malla cristalina amarillenta, a través de la cual el agua se elimina lentamente, con lo cual se retarda el secado.-

La velocidad de desecación varía con la temperatura a que puede someterse el producto durante la operación. Hay productos muy lábiles como el complemento de cobayo, que no deben ser calentados porque se destruyen; lo mismo ocurre con las enzimas. Por lo tanto si se quiere asegurar la bondad de los materiales que se desecan, hay que efectuar la liofilización, no pasando en ningún momento una temperatura mayor que la temperatura ambiente, cuando se trate de sustancias lábiles.-

También tiene su influencia la concentración de las soluciones a desecar.-

Concentraciones mayores del 10% retardan la velocidad de desecación (27).-

La velocidad de desecación varía también con la presión a que se realiza la operación, y con el tipo de aparato que se utilice. Cuando hay un vacío pobre, debido a pérdidas en el sistema, o a bombas de vacío ineficaces, o cuando se trabaja con tubos o recipientes de diámetro delgado, la velocidad de desecación se retarda.-

Debido a que intervienen factores tan diversos, es que no se pueden trazar curvas de velocidad de desecación que se apliquen igualmente a cualquier clase de productos.-

Trabajando con el equipo nº 1, a una presión de 120 micrones, congelando los materiales en forma de anillo, y manteniendo las ampollas a la temperatura ambiente (24°C.) fueron secadas las siguientes sustancias en los tiempos que se detallan:

<u>Sustancia</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Tiempo</u>
Agua corriente	5 ml.	3 horas
Jugo de naranja	5 ml.	4 horas 30 minutos
Albúmina de huevo	2,5 ml.	1 hora 30 minutos
Albúmina de huevo	5 ml.	3 horas 10 minutos
Leche de vaca	5 ml.	3 horas 30 minutos

Dentro del tiempo establecido, se incluye un adicional de alrededor de 30 minutos, que es necesario para asegurar un secado perfecto.-

Se ve que para la mayoría de las sustancias secadas, cantidades de 5 ml. requieren un tiempo de $3\frac{1}{2}$ horas a 4 horas. Como al aparato pueden conectarse 40 ampollas, sería posible liofilizar unos 200 ml. en el tiempo establecido, lo cual daría una velocidad aproximada de ml. por hora.

En el equipo nº 2, congelando el material alrededor de la superficie del recipiente, trabajando a una presión de 120 micrones y a la temperatura ambiente (22°C.), se obtuvo, con suero sanguíneo y leche una velocidad de 10 ml. por hora.-

Con el equipo nº 4 se realizó la siguiente experiencia para calcular la velocidad de desecación:

El recipiente D fué tarado y en él se pesó 100 gramos de agua corriente. Se congeló en las paredes del mismo, y luego fué liofilizada. La presión durante la experiencia se mantuvo entre 100 y 120 micrones; el recipiente permaneció a la temperatura ambiente (25°C.) durante el curso de la misma.-

Con intervalos de media hora el balón fué pesado, para calcular el peso del agua remanente. Los datos obtenidos se consignan en el siguiente cuadro:

<u>Tiempo</u>	<u>Gramos de agua remanente</u>
Inicial	100 gramos
$\frac{1}{2}$ hora	78,54 gramos
1 hora	62,35 "
$1\frac{1}{2}$ hora	46,50 "
2 horas	37,10 "
3 horas	19,50 "
4 horas	5,20 "
5 horas	1,43 "

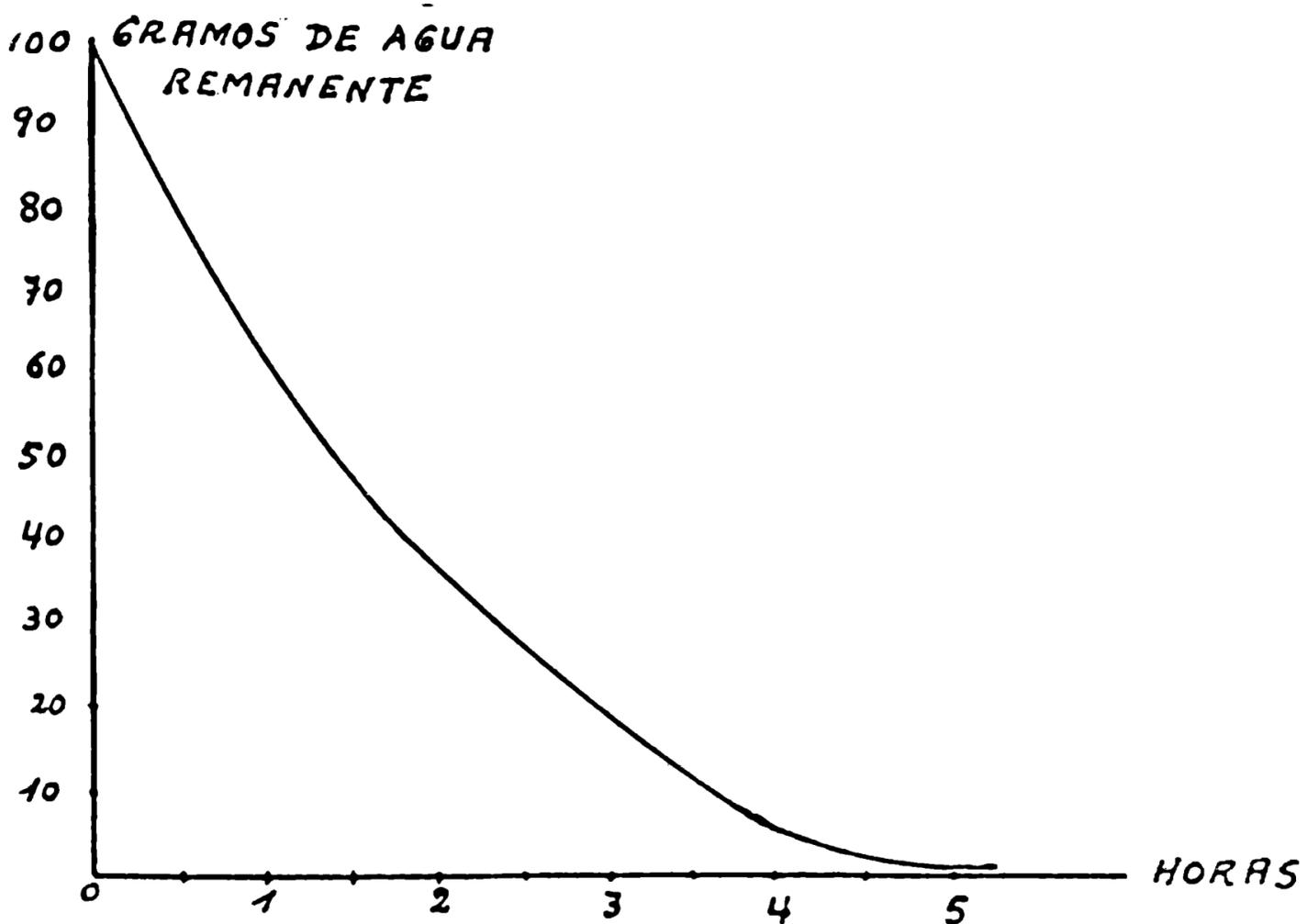
Con estos datos se traza la curva correspondiente que se ilustra en el gráfico nº XVII.-

Se observa en esta curva que al cabo de 4 horas y media, lo que representa el 90% del tiempo total, se ha eliminado la mayor parte del agua, alrededor de un 97%.-

Para eliminar el resto del agua y completar la desecación, hasta eliminar las últimas trazas de humedad, se requiere media hora más, lo que representa un 10% del tiempo total.-

Este equipo nos da una velocidad de desecación de 20 ml. por hora aproximadamente, trabajando en las condiciones establecidas.-

GRAFICO Nº XVII .-



- . Velocidad de desecación .-

- . Conclusiones .-

1ª) No es posible dar datos concretos sobre la velocidad de desecación en el método de secado por liofilización, que se apliquen por igual a cualquier sustancia. Debe determinarse experimentalmente para cada tipo de aparato y para una sustancia dada.-

2ª) Es aconsejable, adicionar un 10% del tiempo total empleado hasta el momento en que el producto está aparentemente seco, para eliminar los últimos vestigios de agua, y asegurar un límite de humedad inferior al 1% .-

-.LECHE DE VACA .-

Se realizaron experiencias con el objeto de determinar los caracteres y composición química de las leches en polvo obtenidas por el método de desecación por liofilización, estudiando al mismo tiempo las alteraciones que pudieran ocurrir en algunos de sus componentes más lábiles, durante el proceso y durante su almacenamiento.-

Se parte de una leche fresca. Se efectúa un análisis de la misma, y simultáneamente se desecan por liofilización 5 muestras en cantidad de 200 ml. cada una.-

Como no era posible liofilizar en mis aparatos 5 muestras de 200 ml. de leche simultáneamente, las mismas fueron desecadas en la planta de liofilización del Instituto de Hemoterapia de la Provincia de Buenos Aires.-

Las muestras desecadas se conservaron en frascos de vidrio cerrados con tapones de goma, asegurando un cierre hermético, y efectuando el vacío en los mismos al final de la operación para eliminar el aire. Estas muestras se mantuvieron a la temperatura ambiente.-

Con intervalos de dos meses, se efectuó un análisis parcial de cada muestra, estudiando las alteraciones que pudieran haber ocurrido en algunos de los componentes de cada una de ellas, para lo cual, previa observación de los caracteres organolépticos, las muestras se reconstituyeron al volumen original de 200 ml. con agua destilada a una temperatura de 30 a 40°C., y se analizaron como si se tratara de una leche fresca.-

Además, en una de las muestras se estudiaron los caracteres físicos y la composición química del polvo obtenido.-

Métodos utilizados en las determinaciones químicas .-

Los métodos utilizados en las determinaciones químicas se enumeran a continuación. Se omite la descripción de algunos de ellos por tratarse de métodos clásicos bien conocidos, y se da importancia especialmente a la determinación de enzimas.-

Humedad: Se determina por el método clásico, colocando en una cápsula tarada una cantidad exactamente pesada de polvo, en la estufa a 105 grados centígrados hasta peso constante, se enfría en el desecador y se pesa.-

Cenizas: Después de determinar la humedad, el contenido de la cápsula se incinera en la mufla. Se deja enfriar en el desecador y se pesa.

Extracto:seco total: En un cristalizador tarado se miden 10 ml. de leche, se añaden tres gotas de ácido acético, se lleva al B.M. a seque-

dad, y se pasa a la estufa a una temperatura no mayor de 95°C. durante una hora. Se enfría en el desecador y se pesa.--

Acidez: Método de Dornic.--

Materia grasa: Método de Gerber.--

Lactosa: Método de Fehling, Causse, Bonnas con la modificación de Lanne.--

Proteínas: Método de Kjeldhal Ronchesse.--

Enzimas:

Catalasas:

La catalasa es una enzima que se encuentra en la leche, que descompone el agua oxigenada liberando oxígeno molecular, que se desprende al estado de gas. Este desprendimiento es tanto mayor, cuando mayor es la concentración de catalasas.--

Para evaluar el índice de catalasas se utilizó el catalasímetro de Gerber. En el frasco del catalasímetro se colocan 10 ml. de leche, se añaden 5 ml. de agua oxigenada al 3%, se tapa y se lleva dos horas a 25°C. Transcurrido dicho lapso, se mide el volumen de oxígeno desprendido.--

El número de cm^3 de oxígeno desprendidos multiplicado por 10 nos da el índice de catalasas.--

Peroxidasas:

La peroxidasa de la leche es una diastasa que descompone el agua oxigenada liberando oxígeno atómico.--

Se pone en evidencia con cualquiera de las siguientes reacciones:

A) Reacción de Rottenfuser: Se toman 10 ml. de leche, se agregan dos gotas de agua oxigenada al 0,3% y 5 gotas de reactivo (solución de clorhidrato de para-fenilendiamina y guayacol). La aparición de color violeta indica reacción positiva de peroxidasas.--

B) Reacción de Storch: Se toman 5 ml. de leche, se añaden dos gotas de agua oxigenada al 0,2% y dos gotas de reactivo (solución de clorhidrato de para-fenilendiamina al 2%). Un color azul indica la presencia de peroxidasas.--

C) Reacción de Arnold: Se toman 10 ml. de muestra, se añaden 5 gotas de reactivo (solución alcohólica de resina de guayaco al 5%) y dos gotas de agua oxigenada. La presencia de peroxidasas se manifiesta por la aparición de un color azul.--

Reductasas:

Son enzimas existentes en la leche, cuya acción exterior visible se manifiesta esencialmente en la reducción del azul de metileno, que se transforma en su leucoderivado.--

Esta acción reductora se puede obtener bajo dos condiciones:

1ª) Agregando a la leche, al mismo tiempo que la solución del indicador una aldehído (formol o aldehído etílico). En este caso la reducción del azul de metileno se efectúa más rápidamente. La diastasa que provoca esta reacción se denomina aldehído-reductasa, o reductasa de Schardin ger.-

2ª) Agregando a la leche simplemente solución de azul de metileno, se observa que éste se decolora al cabo de algún tiempo, bastante largo. Se admite que esta decoloración es debida a una diastasa formada por los microorganismos de la leche, y se conoce con el nombre de reductasa microbiana.-

Se realizó el ensayo para las reductasas microbianas de acuerdo con la siguiente técnica: en un tubo de ensayo se miden 20 ml. de leche, se agregan 0,5 ml. de reactivo (solución alcohólica saturada reciente de azul de metileno) 5ml. y agua destilada 195 ml.). Se cubre con una capa de vaselina líquida y se lleva al B.M. a 40°C., midiendo el tiempo que tarda en decolorarse.-

Hay tablas que indican aproximadamente la cantidad de gérmenes en la leche por cm^3 según el tiempo de decoloración:

<u>Tiempo de decoloración</u>	<u>Número de bacterias</u>
Más de 7 horas	Menos de 100.000 bacterias
Entre 7 y 2 horas	100.000 a 300.000 "
2 horas a 15'	3.000.000 a 20.000.000 bacterias
Menos de 15'	Alrededor de 20.000.000 "

Vitamina C : Se determinó por el método de Willberg B., citado por Gatirner F. (52).-

-. RESULTADOS .-

I - Análisis físico del polvo de leche.-

1) Caracteres: se obtiene un polvo de color blanco, de naturaleza esponjosa, que se deshace por sacudimiento tomando una estructura homogénea. Su olor es agradable y fresco, no indicando manifestaciones de enranciamiento.-

2) Solubilidad: cuando el contenido de cada botella se trata con agua destilada, a una temperatura de 30 a 40°C., para su reconstitución al volumen original, el polvo se disuelve rápidamente al cabo de 3 ó 4 minutos, originando una leche homogénea, libre de grumos, muy semejante

a la primitiva, con un olor y sabor agradables.-

3) Humedad: 2,3%

II - Análisis químico.

Humedad	: 2,3
Cenizas	: 5,7
Materia grasa	: 26,0
Lactosa	: 37,4
Proteínas totales	: 28,5

III - Estudio de las alteraciones de algunos de sus componentes .-

Se detalla a continuación un cuadro comparativo del análisis de la leche original y de los resultados obtenidos del análisis de cada una de las muestras que fueron reconstituidas a su volumen primitivo.

	Leche original	Leche liofilizada y completada a su volumen inicial.			
		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
		2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
Tiempo de conservación					
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Olor	Normal	Agradable	Agradable	Agradable	Agradable
Sabor	"	"	"	"	"
Aspecto	"	Normal	Normal	Normal	Normal
Densidad a 15°C.	1,029	1,0284	1,0286	1,0286	1,0288
Reacción al tornasol	Anfótera	Anfótera	Anfótera	Anfótera	Anfótera
Extracto seco total g.%	11,80	11,05	11,14	11,10	11,07
Acidez (grados Dornic)	17,5	14,5	13,9	13,8	13,8
Materia grasa g.%	3,5	3,4	3,4	3,3	3,3
Lactosa g.%	4,10	3,95	3,94	3,94	3,90
Indice de catalasas	10,5	8,6	8,5	8,7	8,6
Peroxidasas	R. Rotenfusser	Positivo	Positivo	Positivo	Positiva
	R. de Storch	"	"	"	"
	R. de Arnold	"	"	"	"
Reductasimetría:					
(decoloración del azul de metileno)	+ de 7hr.	+ de 7hr.	+ de 7hr.	+ de 7hr.	+ de 7 hr.
Vitamina C mg.%	1,5	1,43	1,35	1,20	1,07

IV - Examen microscópico.-

Las leches reconstituídas examinadas al microscopio, revelan que - la materia grasa no ha sufrido mayores alteraciones, presentando sus glóbulos grasos un grado de dispersión semejante al que se observa en las leches frescas.-

- CONCLUSIONES -

1ª) Por el método de secado por liofilización se obtienen polvos de leche de muy buena calidad, con un olor y sabor agradables. Su solubilidad es muy notable, ya que es posible reconstituir la leche original en pocos minutos, obteniéndose un producto semejante a la leche primitiva de la cual se partió.-

2ª) Las leches en polvo obtenidas por liofilización, tienen una composición química que está de acuerdo con los requisitos exigidos por los códigos bromatológicos.-

3ª) Las sustancias más lábiles, como las enzimas no son afectadas mayormente durante el proceso. Las peroxidases se conservan como en la leche original: efectuando las reacciones citadas con las muestras de leche diluídas, se observó que solamente hay una pequeña disminución de su actividad. En efecto, con la leche fresca se obtuvieron reacciones positivas de peroxidases con diluciones hasta 1/200. En cambio en las leches liofilizadas las reacciones fueron positivas hasta una dilución 1/150.-

El índice de catalasas revela también que estas enzimas no se alteran mayormente durante el secado por liofilización, y se conservan muy bien, ya que solamente ha habido una pequeña destrucción de las mismas.-

4ª) El ensayo de las reductasas indica que durante el almacenamiento no ha habido proliferación de gérmenes apreciable.-

5ª) La vitamina C no se altera mayormente durante el proceso, y durante un período de conservación de varios meses.-

6ª) La acidez de la leche (expresada en grados Dornic) experimenta un ligero descenso. Este aumento de la alcalinidad, probablemente sea debido a la eliminación del anhídrido carbónico durante el proceso.-

7ª) El tenor de materias grasas no experimenta variaciones apreciables, y envasando el producto en perfectas condiciones, no se produce enranciamiento al cabo de ocho meses. En la leche reconstituída los glóbulos grasos tienen un grado de dispersión semejante al de la leche normal.

8ª) Se observa que durante el secado se produce una pequeña degradación de la lactosa. También hay una pequeña disminución en el valor del extracto seco total.-

-. JUGOS DE NARANJA .-

Se realizaron experiencias con el objeto de determinar la disminución del contenido de vitamina C en jugos liofilizados, estudiando al mismo tiempo los caracteres organolépticos de los productos obtenidos.-

Técnica utilizada en la determinación del ácido ascórbico.-

Fue utilizado el método aconsejado por Willberg B. (citado por Gstirner F.-52-), para determinar vitamina C en la leche, que con algunas modificaciones fue aplicado a los jugos de naranja.-

a) Preparación de la solución de 2-6 diclorofenolindofenol N 0,001

Se deslíen con agua en un mortero 140 mg. de colorante, se decanta la solución, y el residuo se vuelve a desleír en agua. Se diluye la solución añadiendo agua hasta un total de 500 ml. y se filtra. El factor de la solución del colorante se determina con ácido ascórbico, valorando con una solución N 0,001 de éste, acidulada con ácido oxálico.-

Para preparar la solución N 0,001 de ácido ascórbico, se disuelven 22 mg. de ácido ascórbico en agua, a la que se han añadido unos 10 ml. de solución saturada de ácido oxálico, y se diluye hasta 250 ml. El contenido de ácido ascórbico de esta solución, se controla valorando con una solución de yodo normal 0,01 sabiendo que 1 ml. de ésta equivale a 0,88 mg. de ácido ascórbico. La solución de éste último ácido, con ácido oxálico, sólo se conserva unos días sin alterar guardada en la obscuridad.-

Con esta solución se controla el factor de la solución de colorante, cada vez que se efectúa una determinación.-

b) Valoración .-

Se toman 5 ml. de jugo de naranja, se añaden 3 ml. de agua destilada y 2 ml. de ácido tricloroacético al 20%. Se agita y se filtra.-

En el líquido filtrado, se tiene una concentración final del 4% de ácido tricloroacético, que es lo que aconseja la F.A. III Edición.-

Se colocan en un tubo de ensayo 2 ml. de la solución de 2,6 diclorofenolindofenol exactamente medidos, y se añade con una pipeta de 1 ml. graduada, el filtrado gota a gota. El colorante vira del azul al rojo intenso, color que se atenúa con el agregado de la solución, siendo el punto final el viraje del rosado al amarillo pálido.-

Se efectúa el cálculo teniendo en cuenta el título de la solución de 2-6 diclorofenolindofenol, y se expresa el dato en mg. por ciento.

Primera experiencia

Se parte de un jugo de naranjas recién exprimido. Se filtra por una gasa y utilizando el equipo nº 1, se liofilizan 12 ampollas con 5ml. de jugo cada una .-

Trabajando a una presión de 120 micrones, y estando las ampollas expuestas a la temperatura ambiente, la operación se realizó en 5 horas. El jugo de naranja toma una estructura de una malla cristalina, a través de la cual el agua se elimina lentamente sobretodo las últimas trazas de humedad. A ello es debido que necesita más tiempo que otras sustancias para su desecación.

Terminada la desecación, las ampollas se cierran al vacío, y se conservan en la heladera.-

Se estudian los caracteres del producto obtenido y se determina periódicamente el contenido de vitamina C .-

Resultados

1 - Caracteres del producto obtenido .-

El jugo de naranja liofilizado, se presenta como un material de estructura cristalina, de color amarillo claro, que permanece adherido a las paredes del recipiente en el cual fué desecado. Posee un olor agradable lo mismo que su sabor.-

Tiene una consistencia blanda, plástica, aunque su contenido de humedad sea inferior al 1%. Es debido a ello, que en los procesos industriales, cuando se procede a descargar las cámaras con el producto desecado, se baja la temperatura de las mismas, porque en esa forma el jugo desecado se torna en un material quebradizo, que permite su manipuleo y envase.

2 - Solubilidad .-

Cuando al jugo de naranja liofilizado, se le agrega agua para su reconstitución, se solubiliza al cabo de 3 a 4 minutos, originando un jugo con un olor y sabor agradables, semejante al de los jugos frescos originales, pero que están más atenuados debido a pérdidas de parte de los compuestos aromáticos.-

3 - Disminución del contenido de vitamina C .-

En el jugo fresco se determinó el tenor de ácido ascórbico.-

Con el objeto de investigar si habían ocurrido pérdidas durante la operación, el contenido de tres ampollas fué llevado a su volumen original con 5 ml. de agua destilada, y se determinó la cantidad de vitamina C en cada una de ellas.-

Las otras ampollas fueron conservadas en la heladera, y se valoró

el ácido ascórbico al cabo de un año en tres de ellas, y a los dos años en las otras tres, para lo cual se añadió previamente a cada una 5 ml. de agua destilada.--

En el cuadro siguiente se expresan los resultados obtenidos, representando cada cifra el valor promedio de tres determinaciones.--

Jugo de naranja

Fresco	Liofilizado y mantenido en la heladera	
Acido ascórbico mg.%	Tiempo de conservación	Acido ascórbico mg.%
55,6	Recién liofilizado	55,6
	1 año	44,7
	2 años	37,3

-. Segunda experiencia .-

Se sabe que los jugos de naranja, aún mantenidos en la heladera, modifican sus caracteres organolépticos después de unas horas, y que el contenido de vitamina C va disminuyendo, hasta que los jugos fermentan al cabo de 6 ó 7 días (53).--

Con el objeto de hacer un estudio comparativo, se exprimen varias naranjas, y el jugo obtenido se divide en tres porciones. Una de ellas se mantuvo en la heladera; otra a la temperatura ambiente. La tercera fracción se colocó en ampollas en cantidades de 5 ml. y se liofilizó en el equipo nº 1.--

Previa exclusión del aire, las ampollas se cierran a la llama, y se mantienen a la temperatura ambiente.--

En cada una de las fracciones se observaron los caracteres organolépticos, y se determinó periódicamente el contenido de vitamina C.--

Antes de cada determinación, a las ampollas con el jugo liofilizado, se les agregó 5 ml. de agua destilada, para la reconstitución del jugo.--

Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

Jugo de naranja mantenido a la temperatura ambiente (20°C.)

Tiempo de conservación	Olor	Sabor	Acido ascórbico mg.%
Inicial	Normal	Normal	53,2
1 hora	"	"	52,8
2 horas	"	"	49,8
3 "	"	"	49,5
4 "	"	"	48,5
12 "	Fuerte	Desagradable	45,2
24 "	Desagrad.	"	41,2
48 "	"	"	40,3
72 "	Fermentado	Fermentado	—

Jugo de naranja mantenido en la heladera

Tiempo de conservación	Olor	Sabor	Acido ascórbico mg.%
Inicial	Normal	Normal	53,2
1 hora	"	"	53,2
2 horas	"	"	53,2
3 "	"	"	53,2
4 "	"	"	51,5
12 horas	"	"	50,3
24 "	Fuerte	Liger. desag.	43,6
48 "	"	" "	42,8
72 "	"	" "	40,5
4 días	"	Desagradable	38,2
5 "	"	"	36,2
6 "	Ferment.	Fermentado	—

Jugo de naranja liofilizado y mantenido a la temperatura ambiente

Tiempo de conservación	Olor	Sabor	Acido ascórbico mg. %
Inicial	Normal	Normal	53,2
24 horas	"	"	53,2
7 días	"	"	53,2
1 mes	"	"	51,8
2 meses	"	"	49,6
3 "	"	"	48,5
4 "	"	"	46,4
5 "	"	"	45,3
6 "	"	"	44,2
8 "	"	"	41,9
10 "	"	"	39,0
12 "	"	"	37,6

En éste último cuadro, si bien se establece que los jugos liofilizados reconstituídos con agua, tienen olor y sabor normales, hay que hacer notar que son menos pronunciados que en los jugos frescos.--

- CONCLUSIONES -

1ª) En los jugos de naranja mantenidos a la temperatura ambiente, el contenido de vitamina C disminuye rápida y gradualmente, y al cabo de 48 horas fermentan.--

2ª) En los jugos de naranja mantenidos en la heladera, el título de vitamina C disminuye más lentamente, y al cabo de seis días desciende en un 27%, y a los siete días entran en fermentación.--

Estas dos primeras conclusiones, confirman las obtenidas anteriormente por Grau C.A. y Valonciano O.A. (53).--

3ª) Los jugos de naranja liofilizados, envasados en ampollas de vidrio cerradas al vacío, cuando se reconstituyen con agua, se disuelven en pocos minutos, y los jugos obtenidos poseen un olor y sabor agradables, aunque más atenuados que los jugos originales.--

Se pudo comprobar, con algunas ampollas en las cuales la desecación no fué perfecta, que cuando no se reduce el contenido de humedad al grado necesario, los jugos fermentan al poco tiempo, sobre todo si se mantienen a la temperatura ambiente.--

4ª) La vitamina C no se destruye en el método de secado por liofi

lización,--en los jugos de naranja.--

5^a) En los jugos de naranja liofilizados, envasados en ampollas -- de vidrio cerradas al vacío y mantenidos en la heladera, el contenido -- de ácido ascórbico disminuye en un 20% al cabo de un año y en un 33% al -- cabo de dos años.--

6^a) En los jugos de naranja liofilizados, envasados en ampollas -- cerradas al vacío y mantenidos a la temperatura ambiente, la disminu-- ción del contenido de vitamina C es mayor que cuando se mantienen en la -- heladera.-- Al cabo de un año alcanza a un 30% .--

—

ALBUMINA DE HUEVO 1º

Se estudia la solubilidad y los caracteres de la albúmina de huevo desecada por liofilización.-

Se toman varias ampollas con 5 ml. de albúmina de huevo y se liofilizan en el equipo nº 1.-

Se trata de una sustancia que no ofrece ninguna dificultad en su desecación. Trabajado a una presión entre 100 y 130 micrones, con las ampollas expuestas a la temperatura ambiente, la operación se realiza en tres horas y media aproximadamente.-

Caracteres del producto obtenido.-

La albúmina de huevo desecada por liofilización, se presenta como un material de estructura porosa, de color blanco, que por trituración se convierte en un polvo homogéneo.-

Tratada con agua, se disuelve al cabo de algunos minutos, originando un producto de aspecto semejante al de la albúmina de la cual se partió.-

Conserva la propiedad de coagular por el calor, originando un coágulo semejante al de la clara de huevo fresca.-

Al igual que la albúmina de huevo fresca, da positivas las reacciones de coloración (Reacción de Millon, xantoproteíca, reacción del Biuret), y precipita con el alcohol, las sales neutras, los ácidos y sales de metales pesados.-

Conclusiones 1º

1ª) La albúmina de huevo desecada por liofilización, se solubiliza en agua con relativa facilidad.-

2ª) La albúmina de huevo desecada por liofilización, no sufre alteraciones físicas y químicas apreciables, por lo cual se puede decir que no ocurre desnaturalización de la misma durante el proceso.-

- COMPLEMENTO DE COBAYO -

Como fué establecido en el Capítulo V, la conservación de la actividad complementaria del suero de cobayo liofilizado, es la mejor indicación del gran valor de este método de desecación.-

Se ha demostrado que el complemento de cobayo liofilizado, almacenado a 5°C. se mantiene hasta un período de cinco años, y las experiencias que he realizado, solamente con un aparte que confirma lo establecido por otros investigadores (13); (18) y (27) .-

Fuó utilizada la técnica recomendada por Boerner F., Flondorf E.W. y Lukens M. (13).-

La sangre proveniente de varios cobayos, se centrifuga inmediatamente después que se ha formado el coágulo, para separar el suero. Los autores mencionados indican efectuar un control previo de cada suero de cobayo por separado, para seleccionar y utilizar únicamente aquéllos que son satisfactorios.-

Si el suero no se ha de liofilizar inmediatamente, se debe conservar congelado, o sino se lo conserva en la heladera con el agregado de un volumen igual de la siguiente solución estabilizante:

Acetato de sodio anhidro	: 12 gr.
Acido bórico	: 4 gr.
Agua destilada estéril	: 100 ml.

Si se usa acetato de sodio cristalizado, se pesan 20 gr.

El suero proveniente de la sangre de varios cobayos, recién extraída, se le determina la actividad complementaria, y simultáneamente se le agrega un volumen igual de solución estabilizante, y se divide en dos porciones:

Una de ellas se conservó en la heladera y se le determinó la actividad complementaria cada tres días, con el objeto de establecer, el tiempo que mantiene su actividad con el agregado de la solución estabilizante.-

La otra porción, después de haber permanecido tres horas en la heladera, se distribuyó en ampollas en cantidades de 2 ml. (corresponde a 1 ml. de suero), y fué liofilizada en el equipo n° 1. Las ampollas se cierran al vacío, y se conservan en la heladera, determinando periódicamente la actividad complementaria del suero.-

Método utilizado en la titulación del complemento .-

Fuó utilizada la técnica Sordelli - Miravent .-

Elementos utilizados .-

1ª) Antígeno: Se utiliza el de Bordet-Guélens en la dilución 1/20. Se toma 1 ml. de antígeno y se evapora a 37°C. en la estufa. Se emulsiona el extracto con 2 ml. de agua destilada agregada gota a gota y agitando. Se agregan luego 18 ml. de suero fisiológico, con lo que se obtiene la dilución 1/20.-

2ª) Complemento: Se diluye 1/20 con suero fisiológico.-

3ª) Suspensión de glóbulos rojos: Se utilizan glóbulos rojos de carnero lavados con solución fisiológica. La suspensión se hace al 10% del volumen inicial de sangre.-

4ª) Suero hemolítico: Se utiliza suero de conejo anticarnero titulado, de modo que entren en la reacción 5 unidades hemolíticas, para lo cual se diluye en una concentración 10 veces mayor a la de su título. Esta solución se mezcla luego con un volumen igual de la suspensión de glóbulos rojos.-

-.- Técnica .-

	Tubo nº						
	1	2	3	4	5	6	7
Complemento al 1/20	0,13	0,15	0,18	0,21	0,24	0,27	0,30
Suero fisiológico	0,45	0,45	0,40	0,40	0,35	0,35	0,30
Antígeno al 1/20	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Baño María durante 60 minutos a 37°C.

Mezcla de glóbulos y suero hemolítico

1	1	1	1	1	1	1
---	---	---	---	---	---	---

Baño María durante 30 minutos a 37°C.

5ª) Interpretación: El título se expresa por la cantidad mínima de complemento diluido 1/20, necesaria para producir la hemólisis total frente al sistema hemolítico.-

-.- Resultados .-

1 - Caracteres del producto obtenido: El suero de cobayo desecado por liofilización, con el agregado de la solución conservadora, tiene el aspecto de un material fundido, debido al mayor contenido de sales, y no la estructura porosa que se observa en cualquier suero sanguíneo liofilizado.-

Es perfectamente soluble en agua.-

2 - Estudio de la actividad complementaria: Se determinó la actividad del complemento de suero de cobayo mantenido en la heladera con el agregado de igual volumen de solución conservadora.-

Para obtener la dilución 1/20 se toman 2 ml. de la mezcla y 18 ml. de suero fisiológico.-

Para determinar el título del complemento en el suero liofilizado, se hicieron ensayos una vez por mes durante un año, para lo cual, el suero fué reconstituido con el agregado de 1 ml. de agua destilada. En esta forma se tiene un volumen de suero igual al colocado originalmente en el recipiente, que a su vez es diluido con el agregado de 19 ml. de suero fisiológico para obtener una dilución 1/20.-

Los resultados obtenidos se consignan en el siguiente cuadro:

<u>Disminución de la actividad del complemento del suero de cobayo.</u>		
<u>Potencia</u>		
Expresada por la cantidad mínima de complemento diluido 1/20, necesaria para producir la hemólisis frente al sistema hemolítico.-		
<u>Mantenido en la heladora</u>		
<u>Tiempo de conservación</u> --	<u>Con solución estabilizante</u>	<u>Liofilizado</u>
Inicial	0,24	0,24
3 días	0,24	-----
6 "	0,24	-----
9 "	0,24	-----
12 "	0,24	-----
15 "	0,24	-----
18 "	0,30	-----
21 "	Con 0,30 no hay hemólisis	
1 mes	-----	0,24
2 meses	-----	0,24
3 "	-----	0,24
4 "	-----	0,24
5 "	-----	0,24
6 "	-----	0,24
7 "	-----	0,24
8 "	-----	0,27
9 "	-----	0,27
10 "	-----	0,27
11 "	-----	0,30
12 "	-----	0,30

Tanto con el complemento mantenido con la solución estabilizante, como con el liofilizado, se efectuaron reacciones de Wassermann con sueros lúeticos positivos y negativos, comprobándose también el mantenimiento de la actividad complementaria, durante 15 días para el primero, y durante toda la experiencia para el segundo.-

- Conclusiones -

1ª) Se confirma que el complemento de cobayo, mantenido en la heladera, con la solución estabilizante citada, conserva toda su actividad y es aplicable en las reacciones de desviación del complemento con absoluta seguridad dentro de los 15 días.-

2ª) Se confirma que el suero de cobayo, con el agregado de la solución estabilizante, liofilizado y mantenido en la heladera, en ampollas de vidrio cerradas herméticamente al vacío, mantiene su actividad complementaria al cabo de un año, con un descenso mínimo, resultando un producto perfectamente utilizable en las reacciones de desviación del complemento.-

-. SUEROS LUTICOS .-

Se estudió el descenso de las reagentes sífilíticas, en sueros conservados en la heladera, al estado líquido y liofilizados.-

Para determinar el título de estos sueros, fué utilizada la reacción de Kahn cuantitativa, descrita por Kolmar J.A. y Boerner F. (54), empleando antígeno de Kahn standard.-

Con el objeto de apreciar con más exactitud la cantidad de anticuerpos, se efectuaron diluciones más cercanas que las consignadas en la técnica original.-

<u>Nº de dilución</u>	<u>Dilución</u>	<u>Diluciones del suero</u>
1	1	Suero original
2	5	0,1 de suero y 0,45 de solución fisiol.
3	10	0,1 " " " 0,9 " " "
4	13	0,1 " " " 1,2 " " "
5	15	0,1 " " " 1,4 " " "
6	17	0,1 " " " 1,6 " " "
7	20	0,1 " " " 1,9 " " "
8	23	0,1 " " " 2,2 " " "
9	25	0,1 " " " 2,4 " " "
10	27	0,1 " " " 2,6 " " "
11	30	0,1 " " " 2,9 " " "
12	35	0,1 " " " 3,4 " " "
13	40	0,1 " " " 3,9 " " "

Se prepara una suspensión del antígeno como para la prueba regular de Kahn, y se coloca 0,01 de suspensión en cada tubo de reacción.-

Se agrega a cada tubo 0,15 ml. de las diluciones obtenidas, y se mezclan bien durante 10 segundos.-

Se agita 3 minutos en el agitador mecánico.-

Se adiciona 0,5 ml. de suero fisiológico a cada tubo y se efectúa la lectura.-

Interpretación de los resultados:

Un precipitado definido (+ + + + , + + + 0 + +) se considera reacción "positiva", en tanto que uno negativo o débil (+ , +) se considera "negativa".-

Los resultados se expresan en unidades Kahn, de acuerdo con la siguiente fórmula: $S = 4 D$, siendo S las unidades Kahn y D la dilución máxima cuya lectura es de dos cruces (++) .-

Si sólo se produce precipitado (4 cruces, 3 cruces o 2 cruces) en

el tubo de suero sin diluir, sin haberlo en ninguno de los que está diluido, el resultado se da respectivamente 4 unidades, 3 unidades o 2 unidades.-

Experiencia - -

Se parte de un suero luético con un título de 80 unidades Kahn, el cual se divide en dos fracciones: una de ellas se conserva en la heladera. La otra se distribuye en ampollas en cantidades de 3 ml. y se liofiliza en el equipo n.º 1, estando el material expuesto a la temperatura ambiente durante toda la experiencia. Estas ampollas se cierran herméticamente al vacío, y se conservan en la heladera.-

Periódicamente se determina el título de las reagentes sífilíticas en ambas fracciones, para lo cual las ampollas con el suero liofilizado se llevan a su volumen original con el agregado de agua destilada. Antes de efectuar la reacción, los sueros se inactivan de acuerdo a la práctica corriente.-

- - Resultados - -

1.º) Caracteres del producto obtenido.-

El suero desecado por el método de liofilización, se presenta como un material de estructura porosa, de color nábar claro.-

Es muy soluble en agua, y una vez reconstituido presenta una ligera turbidez, que se atribuye a cambios del estado de dispersión coloidal de los lípidos.-

2.º) Decenso de las reagentes sífilíticas en un suero luético.-

<u>Tiempo de conservación</u>	<u>Potencia</u>	
	<u>Expresada en unidades Kahn</u>	
	<u>Mantenido en la heladera</u>	
	<u>Líquido</u>	<u>Liofilizado</u>
Inicial	80	80
1 mes	80	80
2 meses	68	80
3 "	60	80
4 "	52	80
6 "	40	80
8 "	20	68
10 "	10	68
12 "	3	68

- 6 Conclusiones -

1ª) Los anticuerpos sífilíticos se destruyen en la desecación por el método de liofilización.-

2ª) En los sueros mantenidos en la heladera al estado líquido, -- las reagentes sífilíticas se destruyen mucho más rápidamente que cuando se conservan en forma de polvo liofilizado.-

- EL PÁNCREAS -

Se realizaron experiencias con el objeto de estudiar los caracteres de los polvos de páncreas obtenidos por el método de desecación por liofilización, observando fundamentalmente el grado de actividad enzimática (poder proteolítico y poder amilolítico) de las pncreatinas obtenidas.-

- Experiencias -

Se parte de un páncreas de cerdo fresco, en el que se titula inicialmente la actividad amilolítica y proteolítica.-

Una parte del mismo páncreas, se tritura en un aparato Turmix, y la papilla obtenida se coloca en un baloncito tarado, y se deseca por liofilización empleando el equipo n° 4. En el polvo de páncreas obtenido, se estudian sus caracteres y se determina nuevamente la actividad proteolítica y amilolítica.-

1 - Determinación de la actividad amilolítica y proteolítica del páncreas fresco.-

Fue utilizada la técnica de la Farmacopea Argentina III Edición.-

Se pesan 10 gramos de páncreas fresco, y se colocan en un mortero con arena de cuarzo y un poco de agua hasta conseguir una pasta bien homogénea. Se pasa a un matraz de 1.000 ml. y se lava el mortero con agua destilada. Se deja así en maceración por espacio de media hora más o menos. Luego se toman de esta solución 10 ml. y se llevan nuevamente a 1000 ml.-

Poder amilolítico.-

Reactivos

Almidón soluble al 1/1000. (1 gr. de almidón se suspende en agua y se agrega a 70 ml. de agua hirviendo que contiene 5 gr. de cloruro de sodio; enfriar, enrasar a 100 ml. Tomar 10 ml. de esta solución y llevar a 100 ml.)

Solución de yodo N 0,01

Escala

Tubos	Soluc. de páncreas	Soluc. de almidón 1%	Título
1	0,10	5 ml.	1-500
2	0,20	5 "	1-250
3	0,30	5 "	1-170

////////



Tubos	Soluc. de páncreas	Soluc. de almidón 1%	Título
4	0,40	5 ml.	1-125
5	0,60	5 "	1-85
6	0,80	5 "	1-65
7	1,00	5 "	1-50
8	1,50	5 "	1-33

Los tubos así preparados se colocan al B.M. a 40°C. durante exactamente una hora, y luego de terminada la digestión se sacan y se pone en cada uno de ellos dos gotas de solución de iodo N. 0,01. El tubo que se colorea azul, o ligeramente color vino, indicará el límite de hidrólisis .--

Poder proteolítico.--

Reactivos

Solución de caseína purísima: Se colocan 200 mg. de caseína en un matraz aforado de 100 ml., se agregan 60 ml. de agua destilada y se agita. Se añaden 2 ml. de solución de Na(OH) N. 0,1 y se calienta a 40° hasta disolver la caseína. Se enfría y se completa a volumen.--

Solución aceto-acética:.....: 1 parte de ácido acético, 9 partes de agua, 10 partes de alcohol .--

Escala .--

Tubos	Soluc. de páncreas	Soluc. de caseína	Título
1	0,30 ml.	5 ml.	1-500
2	0,50 "	5 "	1-200
3	0,70 "	5 "	1-140
4	0,90 "	5 "	1-115
5	1,00 "	5 "	1-100
6	1,5 "	5 "	1-66
7	2,00 "	5 "	1-50
8	3,00 "	5 "	1-33
9	4,00 "	5 "	1-25

También estos tubos se colocan al B.M. a 40°C. durante una hora y luego se pone en cada uno de ellos tres gotas de la solución aceto-al

colólicas, indicando una mayor o menor turbidez la falta de hidrólisis -- en la caseína.--

Resultados: Poder amilolítico : 1/50

Poder proteolítico: 1/33

× 2 - Características del polvo de páncreas obtenido.--

a) Caracteres:

Se presenta como un polvo amorfo, liviano, de color marrón claro, con débil olor a carne. Es parcialmente soluble en agua destilada, dando una solución ligeramente turbia. Es insoluble en alcohol y éter.--

Responde a todos los ensayos consignados en la F.A. -III Edición.--

b) Determinación de la actividad amilolítica y proteolítica.--

Se utilizó la técnica de la F.A. - III Edición.--

Poder amilolítico

Reactivos:

Solución de páncreas en polvo (100 mg. en 500 ml.)

Solución de yodo N.0,01

Solución de almidón al 1%

Escala

Sol. páncreas	Sol. almidón 1%	Gr. de páncreas	Gr. de almidón	Título
0,10 ml.	5 ml.	0,00002	0,005	1-250
0,15 "	5 "	0,00003	0,005	1-166
0,20 "	5 "	0,00004	0,005	1-125
0,25 "	5 "	0,00005	0,005	1-100
0,30 "	5 "	0,00006	0,005	1- 83
0,35 "	5 "	0,00007	0,005	1- 71
0,40 "	5 "	0,00008	0,005	1- 62
0,45 "	5 "	0,00009	0,005	1- 55
0,50 "	5 "	0,00010	0,005	1- 50
0,55 "	5 "	0,00011	0,005	1-45
0,60 "	5 "	0,00012	0,005	1- 41
0,65 "	5 "	0,00013	0,005	1- 38
0,70 "	5 "	0,00014	0,005	1- 35
0,75 "	5 "	0,00015	0,005	1- 33
0,80 "	5 "	0,00016	0,005	1- 31
0,85 "	5 "	0,00017	0,005	1- 29
0,90 "	5 "	0,00018	0,005	1- 28
0,95 "	5 "	0,00019	0,005	1- 26
1,00 "	5 "	0,00020	0,005	1-25

Se procede en la misma forma que en el caso del páncreas fresco.--

Poder proteolítico

Reactivos:

Solución de caseína purísima al 0,2% (200 mg. en 100 ml. de agua)

Solución aceto-alcohólica compuesta de: 1 ml. de ácido acético

9 ml. de agua

10 ml. de alcohol

Solución de páncreas: tomar 100 mgrs. y completar a 500 con agua.

Escala

Soluc. Páncreas	Sol. Caseína	Gras. páncreas	Grasos Caseína	Título
0,1	5 ml.	0,00002	0,1	1-500
0,2	5 "	0,00004	0,1	1-250
0,3	5 "	0,00006	0,1	1-166
0,4	5 "	0,00008	0,1	1-125
0,5	5 "	0,00010	0,1	1-100
0,6	5 "	0,00012	0,1	1-83
0,7	5 "	0,00014	0,1	1-71
0,8	5 "	0,00016	0,1	1-62
0,9	5 "	0,00018	0,1	1-55
1,0	5 "	0,00020	0,1	1-50
1,1	5 "	0,00022	0,1	1-45
1,2	5 "	0,00024	0,1	1-41
1,3	5 "	0,00026	0,1	1-38
1,4	5 "	0,00028	0,1	1-35
1,5	5 "	0,00030	0,1	1-33
1,6	5 "	0,00032	0,1	1-31
1,7	5 "	0,00034	0,1	1-29
1,8	5 "	0,00036	0,1	1-28
1,9	5 "	0,00038	0,1	1-26
2,0	5 "	0,00040	0,1	1-25

Se procede en la misma forma que en el método detallado para páncreas fresco.-

Resultados

	<u>Poder amilolítico</u>	<u>Poder proteolítico</u>
Páncreas fresco	1,50	1,33
Polve de páncreas obtenido por liofilización:	1-35	1-66

- . Conclusiones .-

1ª) Las enzimas del páncreas (amilasa y tripsina) no se destruyen durante el secado por el método de liofilización.-

2ª) Los polvos de páncreas obtenidos por liofilización responden a las características exigidas por la F.A. III Edición.-

3ª) Las pancreatinas obtenidas por liofilización tienen una actividad enzimática con un título aproximadamente dos veces mayor que el exigido por la F.A. III Edición.-

EXTRACTOS DE LOBULO POSTERIOR DE HIPOFISIS

Se sabe que los extractos de lóbulo posterior de hipófisis, mantenidos al estado líquido a baja temperatura, pierden poco a poco su actividad:

La F.A. III Edición, establece al respecto que los extractos de lóbulo posterior de hipófisis, no deben usarse después de 18 meses de su preparación, salvo comprobación de su título. También establece que los extractos, preparados con polvos tipos para control en las valoraciones biológicas, sólo pueden conservarse activos a 0°C. durante seis meses. Las hipofisinas del comercio tienen también fecha de vencimiento.-

El objeto de esta experiencia, fué determinar si durante el proceso de desecación por liofilización hay destrucción o disminución de la actividad de las hormonas responsables de la actividad pituitaria de los extractos de lóbulo posterior de hipófisis, y observar si los productos liofilizados mantienen su actividad durante un tiempo de conservación más o menos largo.-

Técnica utilizada en la valoración.-

La actividad de los polvos o de los extractos de lóbulo posterior de hipófisis, se expresa en unidades internacionales, siendo una unidad internacional la actividad específica de 0,5 mg. del preparado tipo standard.-

Fuó utilizada la técnica de la F.A. III Edición con algunos detalles del "modus operandi" descrito en la Farmacopea Norteamericana, XIII Edición/-

Preparación de la solución standard .-

Pesar cuidadosamente una cantidad conveniente del polvo tipo de lóbulo posterior de hipófisis, colocar en un pequeño mortero de vidrio o de ágata, y humedecer con unas pocas gotas de una solución de ácido acético al 0,25%. Triturar el polvo humedecido totalmente hasta que tenga una consistencia impalpable. Añadir unos pocos c.c. de solución de ácido acético al 0,25% y agitar la mezcla totalmente. Transferir en un frasco Erlenmeyer, lavar el mortero con solución de ácido acético, y añadir el lavado a la mezcla. Añadir cantidad suficiente de ácido acético al 0,25% de manera que el volumen final de la mezcla contenga el mismo número de c.c. que el número de mg. del polvo tipo standard de referencia originalmente tomado. Colocar un pequeño embudo en la boca del frasco, calentar la mezcla al punto de ebullición durante no más de un minuto y fil -

trar. El filtrado tiene en cada c.c. los principios activos de 1 mg. del polvo tipo estándar de referencia.--

Colocar esta solución estándar en ampollas de vidrio duro, y esterilizar durante 20 minutos tres días sucesivos a la temperatura del vapor fluente, pero no excediendo de 100°C. Conservar en lugar fresco (5 a 20° C.) .--

Esta solución estándar no debe ser mantenida más de seis meses.

Valoración de la actividad acitólica: El aparato usado para efectuar el ensayo, puede ser cualquier modificación del tipo general para registro de la actividad del músculo liso aislado de mamíferos. Debe estar provisto de un dispositivo exacto para regular la temperatura. La temperatura del baño debe ser mantenida entre 37 y 38°C., pero no variará más que 0.1 grado durante el ensayo. La cámara en la cual es suspendido el útero debe tener una capacidad no menor de 100 c.c. --

Se usan cobayas vírgenes sanas, que pesen entre 175 y 350 gr. - No deben estar preñadas ni en celo. Es recomendable mantener las cobayas en jaulas aparte, lejos de los machos. Matar un cobayo por decapitación, e inmediatamente separar el útero-centero del cuerpo. Suspender un cuerno del útero en un recipiente que contenga solución de Locke-Ringer, uniendo un cuerno del útero a una palanca inscriptora. El baño se oxigena y las contracciones del útero se registran sobre un cilindro.--

Cuando el útero está completamente relajado, lo cual ocurre generalmente en 15 a 30 minutos, el ensayo se para. Diluir con solución fisiológica isotónica cantidades convenientes de la solución estándar y de la preparación a ser ensayada. Determinar la cantidad de la solución estándar diluida, y la cantidad de la preparación diluida a ser ensayada, que administradas alternativamente produzcan una serie de cuatro contracciones de aproximadamente de la misma altura. Luego administrar una tercera dosis de la solución estándar, que sea 25% mayor que las dos dosis precedentes de la solución estándar diluida. Medir la altura de las cinco contracciones. Las primeras cuatro contracciones han de ser consideradas submáximas y equivalentes, y constituyen un ensayo, si la diferencia en la altura entre la más baja y la más alta de estas cuatro es menor que la mitad de la diferencia de altura entre la más baja de las cuatro y la contracción resultante de la dosis aumentada de la solución estándar. De las cantidades requeridas para producir estas contracciones equivalentes, calcular la actividad de la preparación ensayada en unidades internacionales.--

- Experiencias. -

Se parte de un polvo de lóbulo posterior de hipófisis que se titula inicialmente. Con tal objeto se pesa cuidadosamente 50 mg. de polvo, se colocan en un pequeño mortero de vidrio, y se humedece con unas gotas de solución de ácido acético al 0,25%. Se tritura el polvo hasta que la masa tenga una estructura homogénea. Se añaden unos ml. más de solución de ácido acético al 0,25% y se mezcla bien. Se transfiere el contenido a un matraz de 50 ml. y lavando el mortero con solución de ácido acético al 0,25% se completa a volumen. Se coloca un pequeño embudo en la boca del matraz, y se lleva la mezcla a la ebullición durante no más de un minuto. Se filtra.-

Se obtiene así un extracto, que en un ml. tiene los principios activos de 1 mg. de polvo.-

1 - Valoración del extracto obtenido.-

Se procede de acuerdo con la técnica indicada, diluyendo el extracto con la solución de ácido acético al 0,25%, en la proporción 1 : 10 ó 1 : 100 según la sensibilidad del ótero utilizado.-

La actividad se expresa en unidades internacionales, referidas a 1 gr. del polvo del cual se partió.-

2 - Desecación del extracto por liofilización y estudio de su actividad.-

Parte del extracto obtenido, fué distribuido en ampollas en cantidades de 5 ml., y desecado por liofilización empleando el Equipo N° 1. Las ampollas se cierran al vacío y se conservan en la heladera durante un año.-

Cada tres meses se determinó la actividad biológica en los preparados obtenidos.-

a) Caracteres.

Después de la desecación, queda en las ampollas una cantidad muy pequeña de material de color blanco, constituido por sales y los principios activos, del lóbulo posterior de hipófisis.-

b) Determinación de su actividad.

Al contenido de la ampolla se le agregan 5 ml. de solución de ácido acético al 0,25%, y en esta forma se tiene nuevamente un extracto, en el que cada ml. lleva los principios activos correspondientes a 1 mg. de polvo.-

Se diluye en la proporción 1 : 10 ó 1 : 100, según la sensibilidad

del útero utilizado, y se valora de acuerdo con la técnica indicada.-

- . Resultados . -

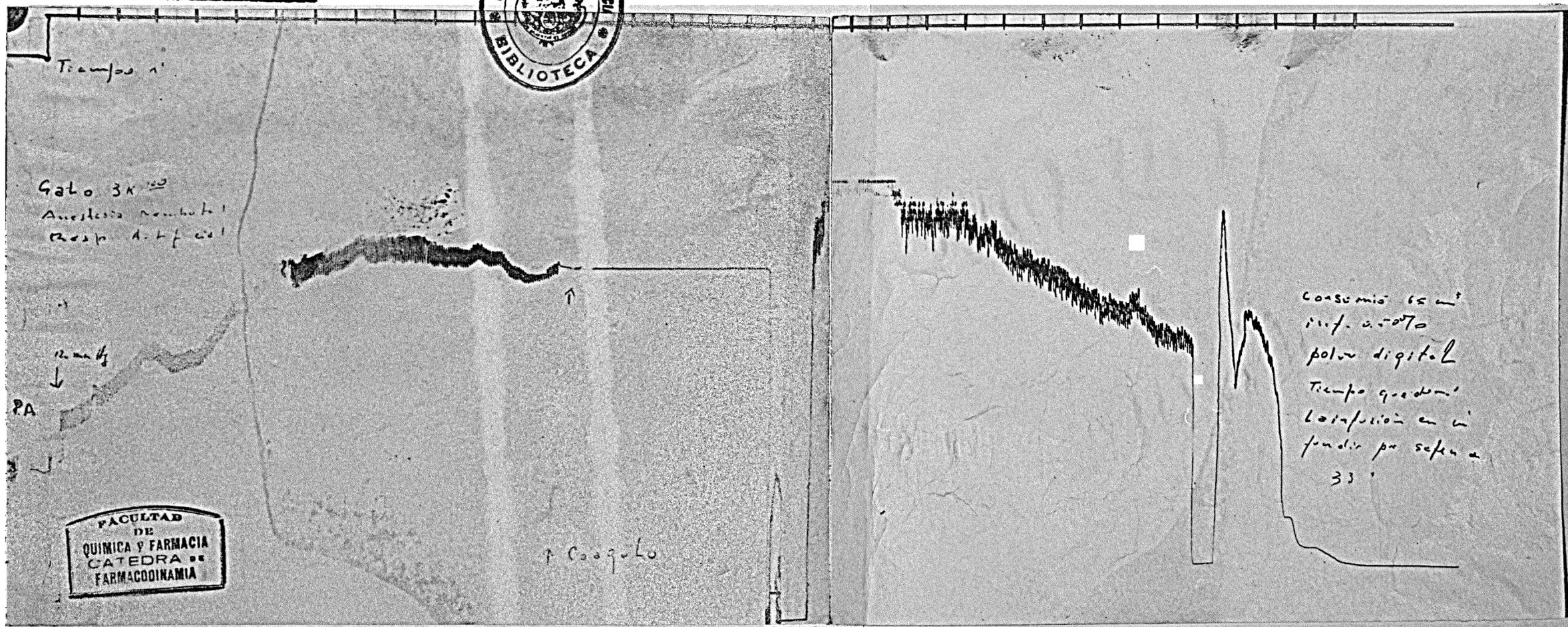
Tiempo de conservación	<u>Título</u>	
	Unidades internacionales referidas a 1 gr. de polvo Extracto inicial (Polvo original)	Extracto liofilizado
Inicial	1100	1100
3 meses	—	1100
6 "	—	1100
9 "	—	1100
12 "	—	1100

- . Conclusiones . -

1^a) Las hormonas responsables de la actividad ootócica, de los extractos de lóbulo posterior de hipófisis no se destruyen durante la desecación por el método de liofilización. No hay disminución de la actividad ootócica apreciable por los métodos biológicos.-

2^a) Los extractos de lóbulo posterior de hipófisis, liofilizados, mantenidos en la heladera, en ampollas de vidrio cerradas al vacío, conservan su actividad durante un período de un año por lo menos.-

ESQUEMA N.º XVIII



100 ml. de infusión0,50 de polvo digital

20 " " "x

x = 0,10 polvo digital

1 kg. gato = 0,10 polvo de digital

El polvo utilizado posee una actividad valorada como unidad gato kg. de 0,10.-

2ª) Comprobación de la actividad digitalica de los volvos liofilizados obtenidos.-

A. Primera experiencia:

Una de las muestras liofilizadas fué llevada al volumen inicial, - agregando 120 ml. de agua destilada estéril, y con esta solución se efectuaron los siguientes ensayos:

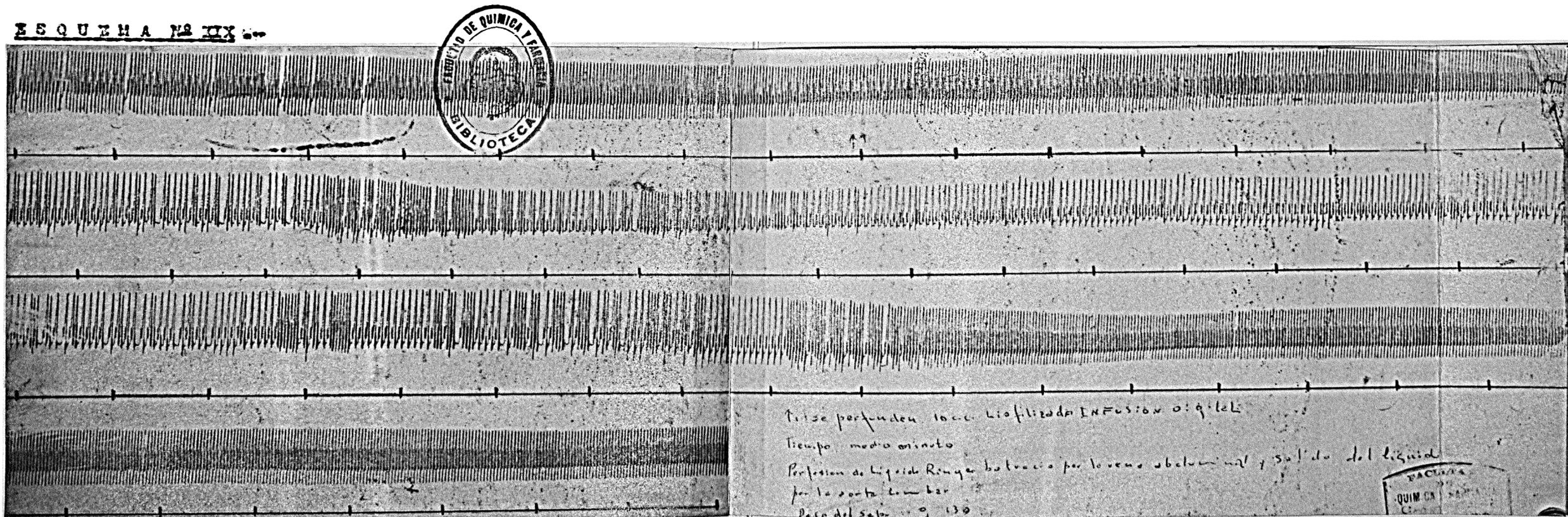
a) Se pone al descubierto la vena abdominal de un *Buffo arenarum*, y luego se identifica la corta superior a la altura de la columna vertebral.-

Por la vena abdominal se canaliza una aguja en conexión directa a una pequeña bureta con el líquido Ringer-batrachio. Luego se corta la -

aorta y se perfunde el líquido Ringer hasta eliminar toda la sangre del sistema.-

Se suspende el corazón y se inscribe el trazado que se observa en el Esquema nº XIX.-

ESQUEMA Nº XIX.-



En 1 se perfunden 10 ml. de infusión de digital liofilizada. Se produce de inmediato un aumento de la amplitud de las contracciones, pero no hay disminución de la frecuencia cardíaca. Se marca el tiempo cada medio minuto.-

Se nota de inmediato un bloqueo cardíaco con síntomas tóxicos en la musculatura, lo que indica que el liofilizado posee actividad de glucósidos digitálicos.- Se sigue perfundiendo líquido Ringer-batracio, y a los veinte minutos de la experiencia, se normaliza el trabajo cardíaco.-

Observaciones:

En el método de perfusión por la gran vena abdominal escurriendo el líquido Ringer por la aorta, suspendiendo el corazón e inscribiendo el trazado, en el Bufo arenarum se observa: aumento en la amplitud de las contracciones, y fenómenos de bloqueo, lo cual indica que el polvo liofilizado posee actividad digitálica.-

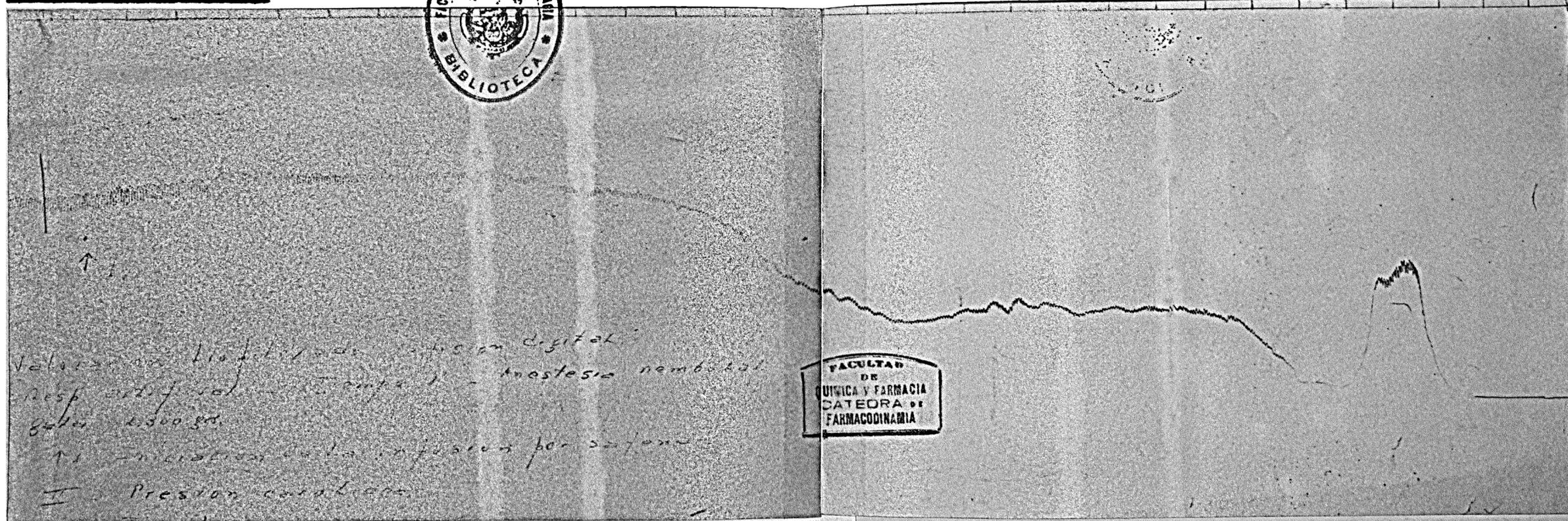
b) Valoración del polvo liofilizado en gato.-

Se ensaya de acuerdo a la técnica de la Farmacopea Argentina III Edición.-

Se utiliza un gato de 2,300 Kg. que se anestesia con nebutal por vía intraperitoneal y se hace respiración artificial.-

Se inscribe la presión carotídea y se marca el tiempo en minutos.-
(Esquema nº XI) .-

ESQUEMA Nº XI.-



Por la vena safena se perfunden ^{en} 30 minutos 49 ml. del liofilizado de infusión de digital, llevado previamente al volumen correspondiente con agua bidestilada hervida y fría. Se comprueba la muerte del animal por autopsia y se examina el corazón.-

Luego:

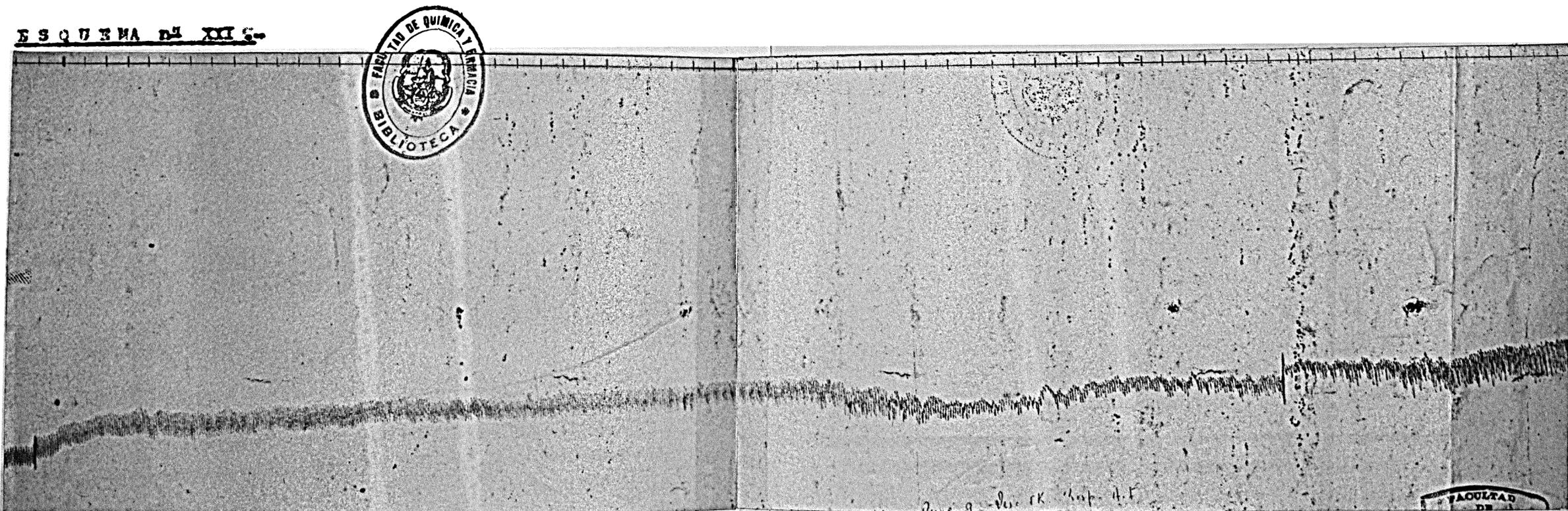
100 ml. de infusión	0,50 polvo de digital
49 " " "	x
	x = 0,24 de polvo
2,300 Kg.	0,24 de polvo de digital
1,000 "	x
	x = 0,104
1 kg. gato =	0,104 polvo de digital

Observaciones:

Como en el ensayo anterior el polvo liofilizado muestra una franca acción digitalica, idéntica a la del polvo original.-

B. Segunda experiencia :**Valoración del polvo liofilizado utilizando un perro en la experiencia.-**

El polvo proveniente de la segunda muestra de infusión liofilizada fué disuelto en agua bidestilada hervida, completando el volumen original de 120 ml.; y se procedió a la valoración en un perro (Esquema XXI)

ESQUEMA N° XXI.-

Se utilizó un perro de 5 Kg. de peso que fué anestesiado con nebutal sódico a razón de 0,04 gr. por kilo de peso.-

Se perfunden 1,5 ml. por minuto y la operación se termina al cabo de 67 minutos , perfundiéndose en total 99 ml.-

Luego, como el liofilizado de digital posee 0,50% de polvo, tenemos

100 ml. de infusión	0,50 polvo digital
99 " " "	x
	x = 0,495

0,495 polvo digital	5 Kg. perro
x " "	1 kilo
	x = 0,099 gramos de digital en polvo

Observaciones:

Como en el caso anterior el polvo liofilizado posee franca acción digitalica.-

- Conclusiones -

1ª) Los glucósidos digitálicos no sufren ninguna alteración, apreciable por los métodos biológicos, en el método de desecación por liofilización.-

2ª) Los polvos obtenidos por liofilización, a partir de infusiones preparadas con polvos de hojas de digital, mantenidos en la heladera en recipientes de vidrio cerrados al vacío, mantienen la actividad de los glucósidos digitálicos inalterable durante un período de dos años.-

- . HIALURONIDASA . -

La hialuronidasa es una enzima, que fué descubierta en 1928 por el Dr. Duran Reynals (55), quien encontró en los extractos testiculares una sustancia que tenía la propiedad de aumentar la permeabilidad del tejido conectivo, razón por la cual le dió el nombre de "factor de dispersión". Se la ha llamado también "factor Duran-Reynals", en honor a su descubridor; factor P (de permeabilidad de los tejidos); factor T (por su origen testicular).--

El nombre de hialuronidasa le fué dado por Meyer y Palmer (56) en 1934, quienes comprobaron la acción hidrolizante de dicha enzima sobre el ácido hialurónico.--

El ácido hialurónico, polisacárido que constituye un componente esencial de la sustancia básica de los tejidos vivos, se desintegra bajo la acción de la hialuronidasa. Esta propiedad, hace que cuando se adiciona la enzima a ciertas sustancias medicamentosas, (sueros, anestésicos, etc.) facilita y acelera la infiltración de los tejidos, razón por la cual también se la denomina "factor infiltrativo".--

Fuentes de origen .--

Se encuentra presente en ciertas bacterias, como estafilococos, estreptococos hemolíticos, neumococos. En las secreciones salivares de algunos insectos, como abejas y arañas; en los venenos de serpientes; en los testículos de pájaros.--

En los animales superiores y en el hombre, se encuentra en los testículos, espermia, riñones, pulmón, en los tejidos embrionarios y placentario.--

Obtención.--

A pesar de la amplia distribución de la hialuronidasa en la naturaleza, la fuente más práctica para su obtención, la constituyen los testículos bovinos.--

En la extracción de la enzima, dos son los métodos que se siguen generalmente:

a) Extracción con agua.--

b) Extracción con solución de ácido acético 0,1 normal.--

Si la extracción resulta fácil, no ocurre lo mismo con la purificación que encierra bastantes dificultades, siendo variados los procedimientos seguidos:

Voy a citar el fundamento de algunos de estos procedimientos:

Morgan y Mc Clean (57), parten del extracto testicular acuoso y lo acidifican con ácido acético normal llevándolo a pH 4,5 . Luego de separar las materias inertes, llevan a pH 6,5 con soda 2 normal, separando nuevamente material inerte.- Después de alcalinizar, precipitan la enzima con acetato básico de plomo. Este precipitado es disuelto en medio acuoso ácido a pH 4,5 , y es purificado por sucesivas diálisis. Finalmente precipitan la enzima con agregado de sulfato de amonio. El precipitado que se separa es disuelto en agua, y es nuevamente dializado, y esta solución de la enzima privada de sales, es evaporada a seco.-

Kaidinaveitia (58), parte de un extracto testicular acuoso, y precipita la enzima con sulfato de amonio, y adsorbe posteriormente con gel de alúmina en medio ácido tamponado con acetato de sodio. Efectúa después la elución en medio alcalino y la solución es finalmente dializada y de secada.-

Claude y Duran Reynals (59), propusieron un método de purificación que consiste en tratar el extracto acuoso de testículo, con igual volumen de ácido acético normal. El primer precipitado es descartado, y el líquido filtrado se le agrega acetona hasta precipitación. El precipitado acetónico, tras deshidratación se extrae con agua descartando el insoluble. A la solución acuosa se le agrega sulfato de amonio hasta semisaturación y se elimina la parte insoluble. Se aumenta después la concentración del sulfato de amonio hasta saturación, y se recoge la fracción activa, la cual disuelta en agua previa diálisis es secada.-

En el procedimiento anterior se basa el método seguido por Soldi y Schifani (60) que esquematizan como sigue:

Extracción (ácido acético 0,1 N.)

Precipitación del extracto con acetona.-

Extracción del precipitado con agua y filtración.-

Saturación del filtrado.-

Diálisis.-

Semisaturación con sulfato de amonio del dializado (descartando el residuo) .-

Saturación del filtrado con sulfato de amonio.-

Diálisis parcial del precipitado.-

Filtración y desecación bajo vacío.-

Constitución química.-

La estructura química de la hialuronidasa es todavía desconocida.- Parece que está unida a una albúmina, y además algunos análisis

cuantitativos revelan cantidades equimoleculares de exoamina, un ácido urónico y ácido acético (61) . También se cree que la estructura de la misma variaría según la procedencia.-

Propiedades físico-químicas.-

Esta enzima se presenta como un polvo de color gris claro, no higroscópico. Es soluble en agua, alcohol diluido y líquidos acidificados. Es insoluble en acetona, éter, alcohol concentrado, cloroformo y piridina. No es dializable.-

Su solución acuosa al 0,5% tiene un pH de alrededor de 6,8 , pero la variación de éste hacia la acidez o a la alcalinidad no origina precipitación. Esta solución acuosa precipita por la adición de ácido tricloroacético, pícrico y tánico, pero no por el ácido acético glacial.-

Da positiva la reacción de Heller con ácido nítrico concentrado. Da positiva la reacción xantoproteica , la del biuret y la de Millon(60)

Propiedades biológicas .-

La hialuronidasa es una enzima cuyo sustrato específico es el ácido hialurónico. Este ácido que representa un componente esencial de los tejidos vivos, más específicamente del tejido conjuntivo, se desintegra bajo la acción de la hialuronidasa . Debido a esta propiedad, es que la hialuronidasa facilita la difusión de los líquidos inyectados, y de ella parten las aplicaciones que tiene como coadyuvante que permite una aplicación más eficaz y beneficiosa de algunos agentes terapéuticos.-

Es discutido si esta enzima tiene o no propiedades antigénicas. Algunos investigadores, afirman haber aislado antihialuronidasas estreptocócicas y neumocócicas en sueros humanos, de especificidad muy estrecha, de modo que cada anticuerpo es producido por un tipo de hialuronidasa. Estas antihialuronidasas aumentarían en el curso de algunas infecciones, como en el reumatismo, y la escarlatina, en que habría un aumento de la antihialuronidasa estreptocócica . Otros investigadores, por el contrario, no han encontrado acción antigénica en algunas hialuronidasas de origen bacteriano (61) .-

Se ha comprobado que la hialuronidasa carece de acción tóxica. Las dosis terapéuticas de la hialuronidasa son completamente inocuas y el coeficiente entre la dosis tóxica y la dosis terapéutica es de 200.000 a 1 .- Esta atoxicidad se ha comprobado en animales, viendo que tiene una amplia zona manejable , puesto que es necesario inyectar una dosis 200.000 veces mayor que la terapéutica para apreciar los primeros sínto

mas de toxicidad. También se ha comprobado la ausencia de toxicidad local y general en el hombre.. Soldi y Schifani (60), comprobaron que la inyección de hialuronidasa, solamente puede producir en algunos individuos, un ligero enrojecimiento del cutis en el lugar de la inyección. Fuera de esto, no se produce ninguna otra reacción local ni general. - Estos investigadores citan también que esto ha sido comprobado por otros como Schwartzman, Henderson y King (62), quienes encontraron que el 9,3% de los pacientes mostraban una reacción local en la primera inyección de la sustancia. Un examen de las características bioquímicas de la sangre (glucemia, azoemia, creatinina, fósforo, fosfatasas, colesterol libre y total, proteínas, reacción de Van der Berg y de Hanger) y de la orina, - llevan a estos autores a la conclusión de que la hialuronidasa no tiene ningún efecto dañoso. También encontraron que no tiene influencia sobre la presión sanguínea, sobre el número de hematias y sobre la fórmula leucocitaria.-

También se ha comprobado, que si bien ejerce acción aceleradora de la absorción de las soluciones, no provoca un aumento de las infecciones ya existentes. Soldi y Schifani (60), inyectaron subcutáneamente 500 unidades viscosinétricas de hialuronidasa, en cuatro individuos con una lesión inflamatoria bien circunscripta, y no observaron ninguna influencia en el proceso inflamatorio localizado. Torres J. y Alonso A. (61), citan al respecto los resultados obtenidos por Warren (1948) sobre conejos y ratones, a los cuales inyectaba cepas de estafilococos, estreptococos y virus vacunal en los primeros, y virus de la poliomielitis y encefalitis murina en los segundos. En ambos experimentos hacía dos grupos con animales: en uno de ellos inculaba el germen y a continuación inculaba hialuronidasa; y al otro grupo inculaba el germen e inyectaba solución salina, para que sirviera de control. Observando los efectos de mortalidad al cabo de un período de tiempo, se demostraba que no había marcada diferencia entre ellas, lo cual prueba que la enzima no produce difusión de la invasión.- Esto estaría explicado porque la hialuronidasa sigue una línea de menor resistencia, que es la externa a la zona de infección, ya que ésta se rodea rápidamente de una zona aislante de fibrina, que no es hidrolizada por la hialuronidasa.-

No obstante, no se aconseja la aplicación de la hialuronidasa en áreas infectadas, ni en zonas cercanas, hasta obtener mayores datos.-

Valoración.-

Hasta el momento no se ha adoptado ninguna unidad internacional para valoración de la hialuronidasa.-

Voy a enumerar el fundamento de los métodos de valoración más empleados citados por Torres J. y Alonso A. (61), que se clasifican en cuatro grupos:

1º) Métodos basados en la velocidad de difusión en organismos, de líquidos inyectados.-

En estos métodos se inyecta intradérmicamente en animales, suspensiones de colorantes (tinta china, hemoglobina, etc.), tanto solas como adicionadas de hialuronidasa, observando el incremento de la velocidad de difusión del colorante en presencia de la enzima. Se emplean conejos albinos, inyectando en cada uno de los costados, previamente depilados la solución testigo y la que contiene la hialuronidasa problema respectivamente; luego se repite la experiencia usando cierta cantidad del fermento puro.-

2º) Métodos viscosimétricos.-

Están basados, en que la viscosidad de una solución de ácido hialurónico disminuye con la adición de hialuronidasa, como consecuencia de la acción hidrolizante de ésta sobre aquél.-

En este hecho se basa el método propuesto por Haldinveitia y Quibell (63); el de Mc Clean y Hale (64); y el de Schwenk citado por Boltraffio (65).-

Unidad reductora de viscosidad (U R V), es la cantidad de hialuronidasa, que reduce en un 50% la viscosidad relativa inicial de una solución tipo de ácido hialurónico, a los 20 minutos y en condiciones exactamente definidas.-

Soldi A. y Schiafani L. (60) utilizan también el método viscosimétrico, empleando como sustrato mucina de cordón umbilical humano, y operando con el viscosímetro de Ostwald mantenido en un baño a 37,5°C. tardando a la velocidad de difusión de 6 segundos para 1,5 de agua destilada. Adoptan como unidad standard, la actividad de hialuronidasa que disuelta en suero fisiológico a diversas diluciones, partiendo de la mínima de 1 en 10.000, y agregada en la proporción de 1/10 del volumen a una solución de mucina de concentración de 0,75%, isotónica por agregado de cloruro de sodio, reduce la viscosidad inicial del sustrato en un 50% en 10 minutos.-

3º) Métodos basados en fenómenos de turbidez.-

Consisten en apreciar la disminución de la turbidez de determinada cantidad de ácido hialurónico, en suero sanguíneo acidificado, después de la adición de la hialuronidasa.-

Se ha establecido la unidad reductora de turbidez (U R T) o --

(T R U) (turbidity reducing unit), que es la cantidad ^{de} hialuronidasa que reduce el enturbiamiento producido por 0,20 mg. de hialuronato de potasio en suero de caballo acidificado, al grado de enturbiamiento producido por 0,10 mg. de hialuronato de potasio, o sea a la mitad.--

41) Métodos basados en la formación de azúcares reductores.--

Rogers (66), en 1948 determina los azúcares reductores, que debido a la acción de la hialuronidasa quedan en libertad por despolimerización del ácido hialurónico, que como se sabe es ^{un} polímero.--

La unidad de azúcares reductores (U.A.R.) es la cantidad de hialuronidasa necesaria para liberar 1 mg. de azúcares reductores, determinados idiométricamente y operando en condiciones definidas.--

Los métodos más usados hasta ahora son los turbidimétricos y los viscosimétricos.--

Aplicaciones.--

El poder infiltrativo de la hialuronidasa, hace que sea un valioso coadyuvante que permite una aplicación más eficaz y beneficiosa de algunos agentes terapéuticos.--

Voy a citar brevemente los principales usos a que se ha destinado la hialuronidasa.--

1 - Hipodermoclisis.--

La hipodermoclisis consiste en la inyección subcutánea de grandes cantidades de líquido, para el restablecimiento del balance acuoso, aplicable a enfermos cuyas venas son pequeñas u ocultas para la inyección, y especialmente a los niños.--

Este método tiene el inconveniente, que al administrar un volumen grande de líquido, se produce una hinchazón dolorosa con distensión de los tejidos, lo que provoca molestias al paciente. Bajo la influencia de la hialuronidasa, la difusión de los líquidos inyectados se hace con más rapidez, la reabsorción es más rápida, de modo que los líquidos no se acumulan en el sitio de la inyección, hay menos tensión dentro de los tejidos y por consiguiente menos dolor.--

Soldi y Schifani L. (60) realizaron experiencias, tomando dos puntos simétricos de la cara externa de los muslos, e inyectando subcutáneamente dos agujas hipodérmicas del mismo calibre, conectadas por dos tubos de goma de igual diámetro interno, a dos frascos idénticos con las soluciones a inyectar y puestos al mismo nivel. La solución de hialuronidasa la agregaban a uno de los frascos, e iniciaban la difusión

del líquido al mismo tiempo en ambos lados. Comprobaron que el tiempo necesario para el vaciado de los frascos era mucho más breve (menos de la mitad) del lado tratado con hialuronidasa; al final de la experiencia, el muslo sin el factor difusor aparecía con un edema duro, y tenso, mientras que el muslo tratado con la hialuronidasa se presentaba uniformemente inhibido de líquido en una vasta superficie alrededor del sitio de la inyección; el paciente notó siempre ausencia de dolor del lado tratado con hialuronidasa, exceptuando un ligero ardor y tensión inicial.

Resultados semejantes han obtenido otros investigadores.--

La aplicación de hialuronidasa en la hipodermoclisis es sencilla y no requiere preparaciones complicadas ni personal especialmente preparado: se elige la cara externa del muslo o la pared abdominal, se empieza la clisis dejando pasar 5 a 10 ml. del líquido antes de agregar la hialuronidasa, de la cual se prepara previamente una solución de 150 T R U en 1 ml. de agua esterilizada, y se inyecta esta solución al tubo de goma 2 cm. encima de su unión con la aguja. Después se permite el flujo libre del líquido.--

2 - Administración de drogas.--

En las inyecciones subcutáneas de varias drogas, la hialuronidasa actúa de la misma manera como en la hipodermoclisis.--

Puede administrarse junto con la penicilina y estreptomina en el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas; con la aminofilina en inyección gota por gota en el tratamiento del estado asmático; asociada con el plasma en pediatría, etc.--

3 - Uso radiográfico.--

La hialuronidasa facilita y acelera la reabsorción de los medios de contraste, cuando se administran subcutáneamente (casos de venas en malas condiciones o niños de cierta edad) --

Los pielogramas resultan tan satisfactorios como si el medio de contraste se inyectara en la vena, si se administra una inyección subcutánea de hialuronidasa previo a la inyección del medio de contraste(61)

4 - Auxiliar en la anestesia local --

La hialuronidasa es un poderoso auxiliar en la anestesia local, ya que facilita la técnica del bloqueo del nervio sin necesidad de inyectar directamente en él. Esta aplicación surgió de las experiencias realizadas por Moore; por Tausing y por Kirb, Echenoff y Looby (citas bibliográficas consignadas por Torres y Alonso -61-) --

Una mezcla de la procaína-hialuronidasa-epinefrina, está en uso para la anestesia regional en la cirugía dental y general. La mezcla citada da resultados satisfactorios por su actuación rápida, por su duración prolongada y por su profundidad.--

Si se agrega hialuronidasa a la procaína o pantocaína, estos anestésicos ganan en profundidad, pero el tiempo de la anestesia de los mismos se reduce en un 50%. Pero si al mismo tiempo se agrega un vasoconstrictor (epinefrina), el tiempo de la anestesia aumenta en un 50%. El vasoconstrictor disminuye la reabsorción, pero no la infiltración.--

Quienes han estudiado esta aplicación de la hialuronidasa, establecen que la epinefrina prolonga el tiempo de la anestesia y profundiza la infiltración al retardar la reabsorción acelerada por la hialuronidasa, mientras que la hialuronidasa, acelera la iniciación de la anestesia y aumenta la difusión tanto de la procaína como de la epinefrina.

Esta triple mezcla se ha usado ya con buenos resultados para operaciones oculares, y para la anestesia local en tonsilectomía.--

También en obstetricia se ha ensayado la anestesia con agregado de hialuronidasa, para aumentar la eficacia del bloqueo del nervio pudendal.--

5 - Otras aplicaciones.--

La hialuronidasa ha sido indicada para el tratamiento del mixedema localizado, que se puede declarar después de la tiroidectomía, y que se manifiesta por la aparición de placas edematosas (67). La sustancia semilíquida albuminosa, del mixedema localizado es parecida al ácido hialurónico, el cual se desintegra por la hialuronidasa. Este hecho indujo a tratar estas placas con dicha enzima. Las placas desaparecen con la inyección de hialuronidasa, pero vuelven a aparecer al suspender el tratamiento.--

También parece estar indicada en el tratamiento de sinovitis, donde si bien no permite una completa curación, parece eliminar muchas molestias (61).--

Torres y Alonso citan también las experiencias realizadas por Harins, sobre la acción de esta enzima sobre los cálculos urinarios, quien comprobó, que estos eran disgregados (in vitro), por el fermento en el tiempo máximo de una hora.--

La falta de toxicidad de esta enzima y sus interesantes propiedades, ofrecen un interesante campo de experimentación, para su aplicación en medicina.--

- . EXPERIMENTACION . -

A) Obtención de la enzima.

Fue utilizado el método de Freeman H.E., Anderson P., Oberg H. y Dorfman A. (68) con algunas modificaciones.

Se parte de testículo de toro congelado (10 Kg.) que una vez descongelado parcialmente, descapsulado, se pica y se extrae con un volumen igual a su peso de ácido acético N 0,1. Se deja en contacto con agitación durante 24 horas, en cámaras frías, a una temperatura menor de 5°C.

Se filtra con pasta de papel, y el residuo se vuelve a extraer con ácido acético N 0,1. Este nuevo extractivo se filtra, reuniendo el filtrado con el obtenido anteriormente.

Al líquido filtrado en frío, se le agregan 212 gr. de sulfato de amonio por cada litro de solución; se deja reposar dos horas en la heladera, se filtra. El precipitado se desecha.

Al líquido filtrado se le agrega sulfato de amonio, en cantidad suficiente para elevar su concentración hasta 42%; se deja en la heladera 24 horas, se centrifuga y se separa el precipitado que se disuelve en cantidad suficiente de agua destilada, y se dializa hasta eliminación total de sulfatos. La diálisis se conduce con agua helada y se mantiene el líquido a una temperatura menor de 5°C. Durante la diálisis se produce un precipitado que se separa por filtración y se desecha.

El líquido dializado se precipita nuevamente con sulfato de amonio a una concentración del 20%; se separa ese precipitado por filtración y se desecha.

Al líquido obtenido se le agrega sulfato de amonio hasta una concentración del 35%. El precipitado obtenido, se separa, se disuelve en agua destilada y se dializa en las condiciones mencionadas anteriormente.

El líquido dializado (aproximadamente 200 ml.) se filtra por bujía esterilizante, se coloca en el balón D (de 500 ml.) del Equipo nº 4, previamente esterilizado, y se liofiliza asepticamente. Luego se reparte en ampollas cerradas a la llama para su conservación en la heladera.

B) Valoración de la hialuronidasa obtenida.

Fue utilizado el método turbidimétrico de Tolksdorf, Cready R., McCullagh y Johnson, (69), cuyo fundamento consiste en apreciar la disminución de la turbidez, de determinar la cantidad de ácido hialurónico, en suero sanguíneo acidificado, después de la adición de la hialuronidasa.

1ª) Preparación de soluciones stocks.

a) Se usan dos buffers, ambos hechos de las siguientes soluciones stock

Acetato de sodio 0,5 M (68,04 g. por ml.)
 Acido acético 0,5 M (30,02 g. por ml.)
Acetato buffer 0,1 M a pH 6,0

Se prepara combinando:

Acetato de sodio 0,5 M. 97 ml.
 Acido acético 0,5 M. 3 "
 Cloruro de sodio 4,384 gr.
 Agua destilada hasta 500 ml.

Esto da una concentración 0,15 M. de cloruro de sodio.--

Acetato buffer 0,5 M. a pH. 4,2

Se prepara combinando:

Acetato de sodio 0,5 M. 130 ml.
 Acido acético 0,5 M. 370 ml.

El pH. de los buffers debe ser controlado frecuentemente y ajustado si fuera necesario.--

b) Hialuronato de potasio.--

Se disuelve en la solución de acetato buffer 0,1 M. a pH. 6,0

Se emplean en general 0,4 mg. por ml.--

Se guarda a 5°C. y se calienta a la temperatura ambiente antes de del uso. Puede quedar a 5°C. sin cambios durante dos semanas.--

c) Hialuronidasa.--

Se disuelve a la temperatura ambiente en acetato-cloruro de sodio buffer a pH. 6,0 --

Se elige la concentración de enzima que 1 ml. contenga 3 unidades aproximadamente.--

La solución de enzima se usa inmediatamente después de hecha.--

d) Solución de proteína acidificada.--

Se prepara diluyendo plasma humano 1 en 10, con acetato buffer 0,5 M. a pH 4,2 y ajustando luego a pH 3,1 con solución 4 N. de ácido clorhídrico.--

Esta solución se coloca en porciones de 50 ml. en tubos de 25 x 200 ml.-- Estos tubos se colocan en baño María hirviente. Cuando el plasma llega a la temperatura de equilibrio (99°C.) se deja en el baño María 30 minutos. Se sacan inmediatamente y se enfrían a la temperatura

ambiente por inmersión en agua helada.--

El plasma se conserva al frío por lo menos dos semanas.--

22) Incubación del sustrato y la enzima.--

Se usan en cada ensayo siete tubos del colorímetro Klett Sumerson

Tubo	Solución sustrato hialuronato	Solución buffer pH. 6,0	Solución enzima hialuronidasa
1	0,50 ml.	0,50 ml.	---
2	0,25 "	0,75 "	---
3	0,50 "	---	0,50 ml.
4	0,50 "	0,10 "	0,40 ml.
5	0,50 "	0,20 "	0,30 "
6	0,50 "	0,30 "	0,20 "
7	0,50 "	0,40 "	0,10 "

Se mezclan los tubos, se sumergen en un baño a 37,5°C. durante 30 minutos. Para inactivar la enzima luego, se sumergen los tubos a 60°C. durante 10 minutos. Luego se enfrían a la temperatura ambiente por corriente de agua.--

Como regla general no se ensayan(más) más de tres fracciones de enzima por vez junto con los ensayos en blanco (17 tubos).--

32) Desarrollo de la turbidez.--

A cada tubo se agregan:

3 ml. de solución acetato buffer a pH. 4,2

1 ml. de plasma acidificado.--

El contenido de cada tubo se mezcla y se deja en reposo a la temperatura ambiente 30 minutos.--

La turbidez se lee al colorímetro fotoeléctrico de Klett Sumerson con filtro azul.--

La lectura 0 del aparato se coloca con un tubo conteniendo:

1 ml. de solución buffer a pH. 6,0

3 ml. de solución buffer a pH. 4,2

1 ml. de plasma acidificado.--

Todos los tubos son enumerados, y su absorción que es variable se determina con la misma mezcla que se usa para determinar el 0 del aparato.--

Para la lectura 0 solamente tubos con absorción 0 se utilizan.--

Las lecturas de los 17 tubos en el ensayo, son corregidas a absorción 0.

4.) Método de cálculo .-

Las lecturas corregidas de turbidez son llevadas a un gráfico -- frente a la concentración de la enzima . Se obtiene así una línea recta desde que el instrumento Klett tiene una calibración logarítmica.--

La concentración de enzima correspondiente a la turbidez del más bajo de los blancos (tubo 2) se lee frente al gráfico. Esto indica la cantidad de enzima conteniendo una unidad reductora de turbidez (turbidity reducing unit o t.r.u.)

Turbidity Reducing Unit (T.R.U.) : Es la cantidad de enzima que -- reduce la turbidez producida por 0,2mg. de ácido hialurónico a la que -- producen 0,1 mg. de ácido hialurónico.--

Resultado

El ensayo de la hialuronidasa obtenida acusó una actividad de 39,8 T.R.U. por mg. de polvo.--

C) Conservación de la hialuronidasa.--

1.) Se estudia la pérdida de actividad de la enzima al estado de solución , mantenida a 4°C. en la heladera, y en la estufa a 37°C.:

Se prepara una solución acuosa a pH. 6,0 en solución buffer de la hialuronidasa que contiene 39,8 T.R.U. por mg. de polvo; la solución se prepara en concentración de 20 mg. de polvo por 100 ml. de solución.--

Una parte de la solución se conserva a 4°C. en la heladera, y la otra en la estufa a 37°C.--

A las 24 horas se observa que la solución conservada en la estufa presenta un precipitado floculoso, que con el tiempo se hace más evidente. Las determinaciones en esta solución se efectúan previa filtración.--

2.) Se observan los efectos de la esterilización a 120°C. sobre -- la hialuronidasa en polvo:

Se somete la enzima a calentamiento en estufa a 120°C. durante media hora. Luego se disuelve en la solución acuosa buffer a pH. 6,0 , en la misma forma que en el caso anterior y se valora.--

3.) Se estudia la estabilidad de la enzima obtenida, conservada al estado de polvo liofilizado, en ampollas cerradas al vacío, y mantenidas en la heladera a 4°C.:

Con tal objeto se efectúa una valoración del polvo liofilizado cada 15 días durante seis meses . Para ello se disuelven 20 mg. de polvo en 100 ml. de la solución buffer a pH. 6,0 y se valora en la forma indicada

Resultados

Los resultados obtenidos expresados en unidades T.R.U. por mg. de polvo se detallan en el cuadro siguiente:

Se inician las experiencias el 9/IV/52 .--

9/IV/52	actividad 39,8 T.R.U. por mg. de polvo (valor promedio)			
	<u>Solución a 4°C</u>	<u>Solución a 37°C.</u>	<u>Polvo este- rilizado a 120°C.</u>	<u>Polvo liofi- lizado (4°C.)</u>
10/IV/52	36,5	19,2	21,5	
11/IV/52	35,7	16	---	
12/IV/52	35,7	15,6	---	
13/IV/52	35,7	12,9	---	
17/IV/52	21,7	menos de 10	---	
24/IV/52	---	---	---	39,8
9/V /52	---	---	---	39,8
24/V /52	---	---	---	39,8
9/VI/52	---	---	---	39,8
23/VI/52	---	---	---	39,5
8/VII/52	---	---	---	39,5
23/VII/52	---	---	---	39,2
9/VII/52	---	---	---	39,2
10/IX/52	---	---	---	39,2
10/X /52	---	---	---	39,2

Conclusiones

1ª) La hialuronidasa conservada en solución acuosa a 4°C. en la heladera, pierde su actividad progresivamente, y esta pérdida alcanza a un 30% al cabo de 8 días.--

2ª) La hialuronidasa mantenida al estado líquido a 37°C. pierde rápidamente su actividad, y al cabo de 8 días su título ha disminuido más del 70% .--

3ª) La hialuronidasa pierde el 50% de su actividad por esterilización a 120°C. durante media hora.--

4ª) La hialuronidasa secada por liofilización y mantenida al estado de polvo, en ampollas cerradas al vacío, a la temperatura de 4°C. en la heladera, mantiene su título durante un período de 6 meses.--

VI - CONCLUSIONES .-

- CONCLUSIONES -

1ª) Las leches en polvo, obtenidas por el método de desecación por liofilización, son de muy buena calidad. Son muy solubles en agua y cuando se reconstituyen originan un producto semejante a la leche primitiva de la cual se partió, con un olor y sabor agradables. Sus componentes químicos, aún los más sensibles, como las enzimas y la vitamina C, no sufren alteraciones importantes durante el proceso. Conservadas en recipientes de vidrio con exclusión del aire y a la temperatura ambiente, mantienen sus propiedades durante un período de un año como mínimo.-

2ª) Los jugos de naranja, obtenidos por el método de desecación por liofilización, son muy solubles en agua, y cuando se reconstituyen se obtienen jugos con un olor y sabor agradables, aunque algo más atenuados que el de los jugos frescos. Mantenidos en la heladera, en recipientes de vidrio cerrados al vacío, conservan sus propiedades durante un período de dos años por lo menos. La vitamina C no se destruye durante el proceso. En los jugos conservados a la temperatura ambiente, la vitamina C al cabo de un año, mantiene el 70% de su actividad. En los jugos liofilizados conservados en la heladera, la vitamina C al cabo de un año, mantiene el 80% de su actividad y a los dos años el 67%.-

3ª) La albúmina de huevo desecada por liofilización, no sufre alteraciones físicas y químicas apreciables, y es perfectamente soluble en agua.-

4ª) Se confirma que el complemento de suero de cobayo, liofilizado con el agregado previo de una solución estabilizante, y envasado en ampollas de vidrio cerradas al vacío en la heladera, mantiene su actividad al cabo de un año.-

5ª) En los sueros lúcticos desecados por liofilización, conservados en la heladera en ampollas de vidrio cerradas al vacío, los anticuerpos sífilíticos se mantienen al cabo de un año con un descenso mínimo de su actividad.-

6ª) Las enzimas del páncreas (amilasa y tripsina) no se destruyen durante el proceso de desecación por liofilización. Los polvos de páncreas que se obtienen por liofilización, tienen una actividad enzimática, cuyo título es aproximadamente dos veces mayor que el exigido por la Farmacopea Argentina - III Edición.-

7ª) Las hormonas responsables de la actividad ocitócica de los extractos de lóbulo posterior de hipófisis, no se destruyen durante la desecación por el método de liofilización. Los extractos de lóbulo posterior de hipófisis desecados por liofilización, mantenidos en la he

ladera, en ampollas de vidrio cerradas al vacío, conservan su actividad, sin ninguna variación, durante un período de un año.-

82) Los glucósidos digitálicos no sufren ninguna alteración apreciable por los métodos biológicos, durante la desecación por el método de liofilización. Los polvos obtenidos por liofilización, a partir de las infusiones preparadas con polvo de hojas de digital, mantenidos en la heladera, en recipientes de vidrio cerrados al vacío, mantienen la actividad de sus glucósidos digitálicos después de un período de 2 años

92) La hialuronidasa conservada en solución acuosa a 4°C. en la heladera, pierde su actividad progresivamente, y esta pérdida alcanza a un 30% al cabo de ocho días.-

102) La hialuronidasa, mantenida al estado líquido a 37°C., pierde rápidamente su actividad, y al cabo de 8 días su título ha disminuido más del 70%.-

112) La hialuronidasa pierde el 50% de su actividad por esterilización a 120°C.-

122) La hialuronidasa desecada por liofilización, y mantenida al estado de polvo, en ampollas de vidrio cerradas al vacío, a la temperatura de 4°C. en la heladera, mantiene su título durante un período mínimo de seis meses.-

Albano

V I I - B I B L I O G R A F I A

VII - BIBLIOGRAPHIA -

- 1 - Shackell L.F., Am J.Physiol, 24 , 325 (1.909).--
- 2 - Elser T.J., Thomas R.A. y Steffen G.I., J,Immunol., 28 , 433 (1935)
- 3 - Rogers L.A., J.Infections Diseases, 14 , 100 (1914).--
- 4 - Swift H.F., J.Exper.Med., 31 , 69 (1921).--
- 5 - Sawyer W.A., Lloyd W.D.M. y Kitchen S.F., J.Exper.Med.,50, 1 (1929).--
- 6 - Flosdorf E.W. y Mudd S., J.Immunol., 29 , 389 (1935).--
- 7 - Hartley P., Quart.Bull.Hlth.Org.L.D.H., 5 , 735 (1936), n/10.--
- 8 - Greaves R.I.K. y Adair Maribel E., J.Hygiene, 36 , 507 (1936).--
- 9 - Flosdorf E.W. y Mudd S., J.Immunol., 34 , 469 (1938).--
- 10- Greaves R.I.K.y Adair M.E., J.Hygiene, 39 , 413 (1939).--
- 11- Hill J.M. y Pfeiffer D.G., Ann.Int.Med.,14 , 201 (1940).--
- 12- Flosdorf E.W.,Stokes F.J. y Mudd S.,J.Am.Med.Assoc.,115, 1905 (1940).--
- 13-Boerner F.,Flosdorf E.W. y Lukens M.,Am.J.Elin.Path.,11.122 (1941).--
- 14- Christensen Royal L.,J.Lab.Clin.Med.,27 , 799 (1942).--
- 15 -Strumia Max M. y Mc Graw L.,J.Lab.Clin.Med.,28 , 1140 (1943).--
- 16- Campbell Dan H. y Pressman D., Science , 99 , 285 (1944).--
- 17- Seegers Walter H., Science, 101, 284 (1945).--
- 18- Flosdorf E.W.,Hull L.V. y Mudd S., J.Immunol., 50, 21 (1945).--
- 19- Flosdorf E.W.,Brit.Med.J., 1 , 216 (1945).--
- 20- Flosdorf E.W., Food Industries, 22 , 5 (1945).--
- 21- Machado Juan A.,Revista Argentina del Frío, 10 , 104 (1946).--
- 22- Bradish J.C.,Brain C.M. y Mc Farlane A.S., Nature, 159 , 28 (1947).--
- 23- Friedgood H.B., Enagen A.J., Garst J.B. y Steintz L.,Science,105 , 99 (1947).--
- 24- Chambers Melvin A. y Nelsons Ebon E., J.Am.Ph.Assoc.,34, 323 (1950)
- 25- Greaves R.I.K.,J. Hygiene, 41 , 489 (1942).--
- 26- Greaves R.I.K., Med. Res.Council.,Special Report. Series n^o 258 (1946) a/27 .--
- 27- Flosdorf E.W.,Freeze-Drying, 1^a ed.,Reinhold Publishing Corporation , (1949) .--
- 28- Tschudin K., Helv.Phys. Acta, 19 , 91 (1946).--
- 29- Warren J., Proc..Soc.Exper. Biol.Med.,66 , 381 (1947).--
- 30- Wyckoff R.W.G. y Lagudin J.B., Am.J.Clin.Path., 8 , Tech Sect 10(1944)
- 31 -Flosdorf E.W., Ind. Eng.Chem.Anal.Edit., 17 , 198 (1945).--
- 32- Mudd S., Flosdorf E.W., Eagle H.,Stokes J.y Mc Guinnes A.C., J. Am.-- Med. Assoc., 107 , 956 (1936).--
- 33- Mc Guinnes A.,Stokes J. y Armstrong J.G., Am.J.Med.Sci., 205 , 826 -- (1943).--

- 34- Barondes R. de R., Military Surgeon., 101 , 306 (1947) a/27.-
- 35- Krejci Laura E., J. Franklin Inst., 234 , 596 (1942).-
- 36- Cohn E.J., Oncley J.L. , Strong L.E., Hughes W.L. y Armstrong S.H.J.
J. Clin. Invest., 23 , 417 (1944).-
- 37- Koop C.E., Am. J. Med. Sciences , 211 , 233 (1947).-
- 38- Lahiri D. C., Indian J. Medical Research, 35 , n^o 1 pp.7 (1947)a/27.
- 39- Siler J.F., Am. J. Pub. Health. 26 , 219 (1936).-
- 40- Welch H., Borman E.K. y Mickle F.L., Am. J. Pub. Health, 29, 35(1939)
- 41- Flosdorf E.W. y Kimball A.C., J. Bact., 39 , 255 (1940).-
- 42- Appleman M.D. y Sears O.H., J. Bact., 52 , 209 (1946).-
- 43- Siedentopf H.A. y Green R.G., J. Infectious Diseases, 71 , 253(1942)
- 44- Sherr H.W., Flosdorf E.W. y Shaw D.R., J. Immun., 34 , 447 (1938).-
- 45- Hoffstadt R.E. y Trippi H.B., J. Infectious Diseases, 78 , 183(1946)
- 46- Hunce T.W. y Reichel J., Am. J. Veterinary Research, 4 , 270(1943)q/27
- 47- Schade A.L. y Caroline L., J. Bact., 45 , 463 (1943).-
- 48- Seibert F.B. y Du Four E.H., Am. Rev. Tuberculosis, 41 , 471 (1940).-
- 49- Hetherington D. C., Proc. Soc. Experimental Biol. Med., 57, 196 (1944)
- 50- Dounce A. y Howland J.W., Science, 97 , 21 (1943).-
- 51- Tyckoff R.W.G., Science, 104, ^{31M/}36 (1946).-
- 52- Gatirner F., Métodos físico-químicos para la determinación de vitaminas, 3^a edic., Manuel Marín, pag. 198, (1944).-
- 53- Grau C.A. y Valenciano O., Revista Farmacéutica, 20, 154(1948).
- 54- Kolmer J.A. y Boerner F., Métodos de Laboratorio Clínico, 4^a edic. Editorial Interamericana S.A., pag. 781 (1948).-
- 55- Duran Reynals F., J. Exp. Med., 50 , 327 (1929).-
- 56- Meyer K. y Palmer J.W., J. Biol. Chem., 107, 629 (1934).-
- 57- Morgan y Mc Clean D., J. Path. Bact., 31, 1045 (1930)
- 58- Maidinavetia, Biochem. J., 32 , 1806 (1938).-
- 59- Claude y Duran-Reynals F., J. Exp. Med., 65 , 661 (1937).-
- 60- Soldi A. y Schizfani L., Il Farmaco, 4 , 649 (1949).-
- 61- Torres J. y Alonso A., Ion, 105 , 203 (1950).-
- 62- Schwartzman, Henderson y King, J.A.M.A., 131 , 261 y 1115 (1949).-
- 63- Maidinavetia y Quibell, Biochem. J., 34 , 625, (1940).-
- 64- Mc Clean D. y Hale, Biochem. J., 35, 159 (1941).-
- 65- Beltraffio, Il Farmaco, 3 , 51 (1949).-
- 66- Rogers, Biochem. J., 42 , 633 (1948).-
- 67- Roman D., New York State J. Med., 50 , 1939 (1950).-
- 68- Freeman M.E., Anderson P., Oberg M. y Dorfman A., J. Biol. Chem., 180 , 655 (1949).-
- 69- Tolksdorf S., Cready M. Mc Cullagh R. y Schwenk E., J. Lab. Clin. Med., 34 , 74 (1949).-