

Teórica 3.

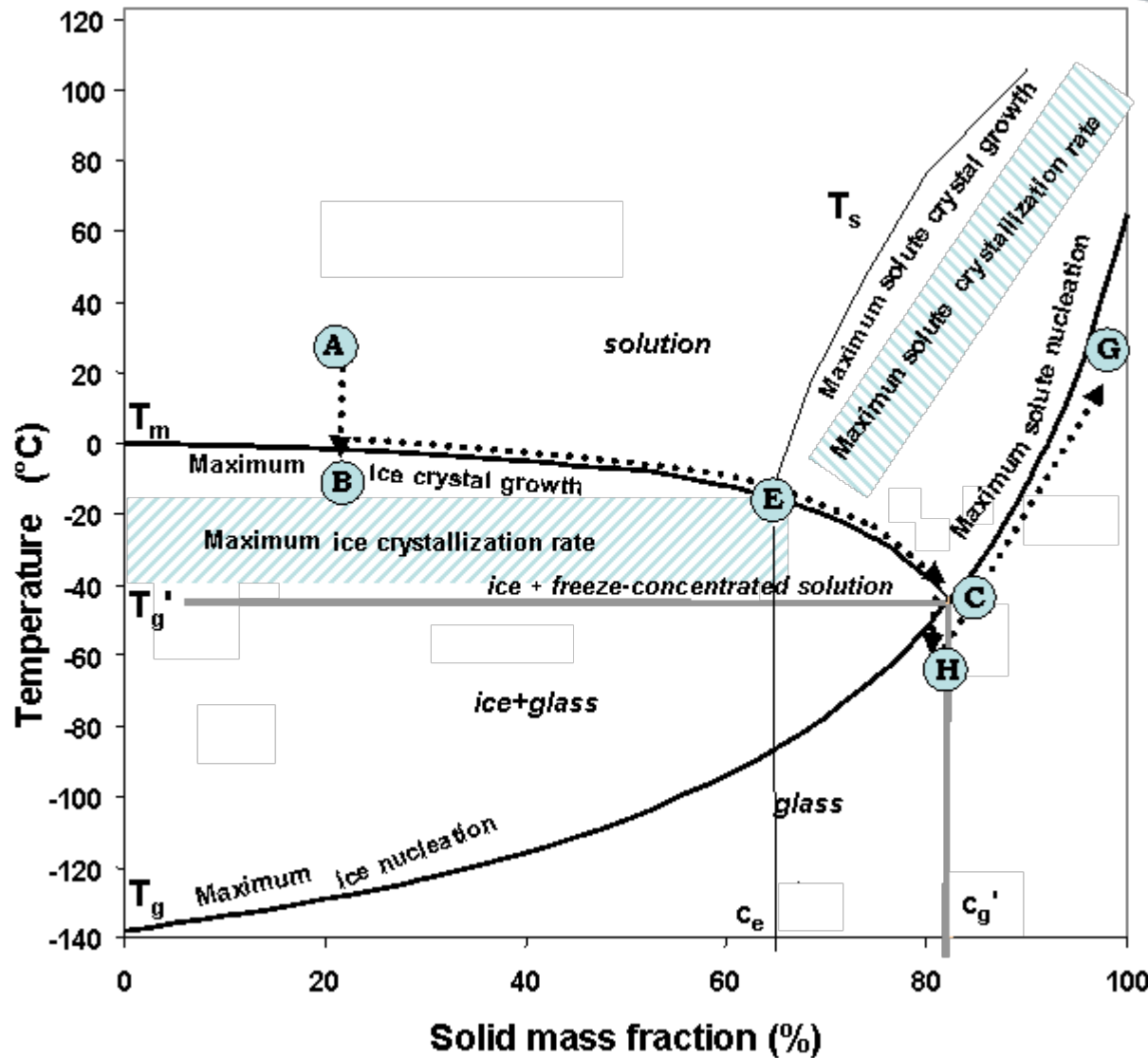
Liofilización

¿Qué es la liofilización?

Es una forma de secar un producto a bajas temperaturas sin el deterioro que produciría el calentamiento.

Por medio de la **liofilización** se pueden preservar muchos tipos de productos biológicos por períodos prolongados sin daño en la calidad o viabilidad.

primero **se congela** la parte acuosa del sistema que se desea liofilizar y, a esa baja temperatura que impide cambios químicos de deterioro, se la somete a un **alto vacío**, sublimando el agua desde el **estado sólido al estado gaseoso**, sin pasar por el estado líquido.



Vitrificación por liofilización

Antecedentes

(oficiales para el mundo occidental)

1900. Descubridor: Altman, desarrollo: Gersh.

1930. Sólo una curiosidad de laboratorio.

1945. Liofilización de plasma humano EUA, Francia, R.U.

**Sir Ernst Boris Chain premio Nobel
preservación de penicilina**

Charles Merieux estabilización de vacunas

Antecedentes globales

Los incas emplearon esta tecnología muchos siglos atrás para secar carne congelada empleando la energía radiante del sol y la baja presión de las alturas del altiplano andino.

¿Para qué liofilizamos?

Hay dos aplicaciones generales del secado por liofilización:

- **preservación o estabilización de productos alimenticios de alto valor agregado, biológicos o farmacéuticos.**
- **producción de estructuras porosas definidas o superficies internas tales como esponjas de colágeno, catalizadores, etc.**

Aplicaciones de la liofilización:

sangre, plasma, suero, soluciones de hormonas, productos farmacéuticos, alimentos e ingredientes.

Materiales especiales para transplantes, como arterias, piel y huesos.

Células que deben permanecer vivas largos períodos. Esto incluye bacterias, virus y levaduras, pero no células de mamíferos.

La liofilización se emplea para la preservación de biomateriales debido al hecho de que en el producto obtenido está inhibido el crecimiento de microorganismos y de reacciones químicas de deterioro.

El proceso facilita la distribución y almacenamiento ya que no es necesario mantener la cadena de frío.

El producto obtenido es fácil de rehidratar.

Diferencias con otras formas de secado:

La **movilidad** del agua y los solutos durante el proceso

La **temperatura**: en liofilización $< -30^{\circ}\text{C}$, en secado entre 50 y 100°C .

Esto determina:

- **Estabilidad química** durante el proceso
- Generación de una **estructura adecuada.**
- Características de **rehidratación** adecuadas.

La liofilización es un proceso que involucra tres etapas:

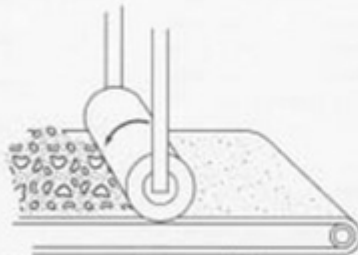
- **Congelación:** la mayor parte del agua se convierte en hielo.
- **Sublimación:** el hielo pasa a estado vapor.
- **Desorción:** Casi toda el agua no congelable se convierte en vapor y se remueve.



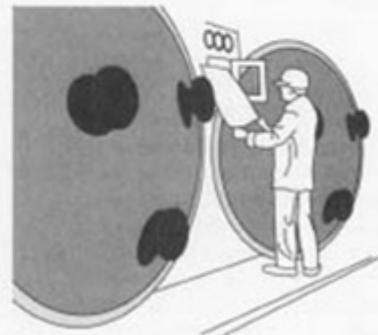
Some foods are cooked before freeze drying;
fruits and vegetables are just washed with water.



The food pieces are spread on flat metal trays
on wheeled carts and placed in a coldroom,
where the temperature can be as low as -40°F .



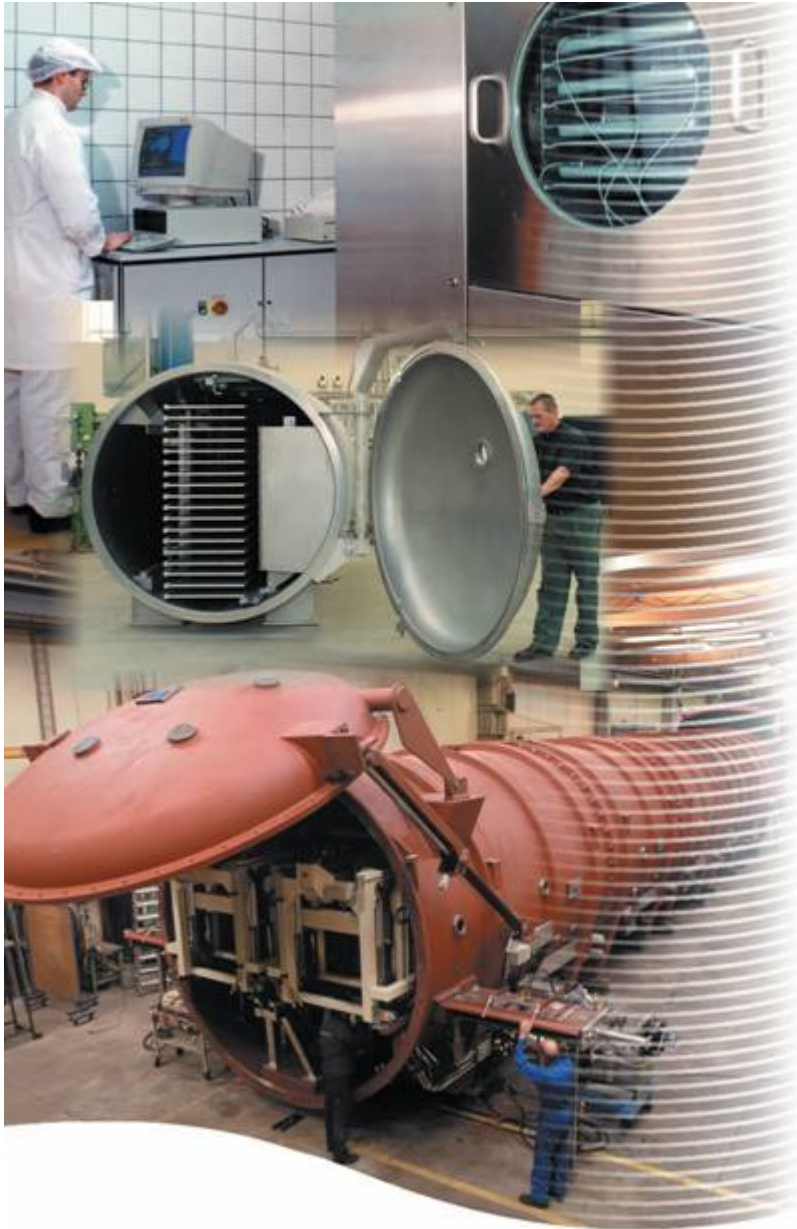
Some food pieces may be ground further or reduced
to a powder. Two or more products may be blended.

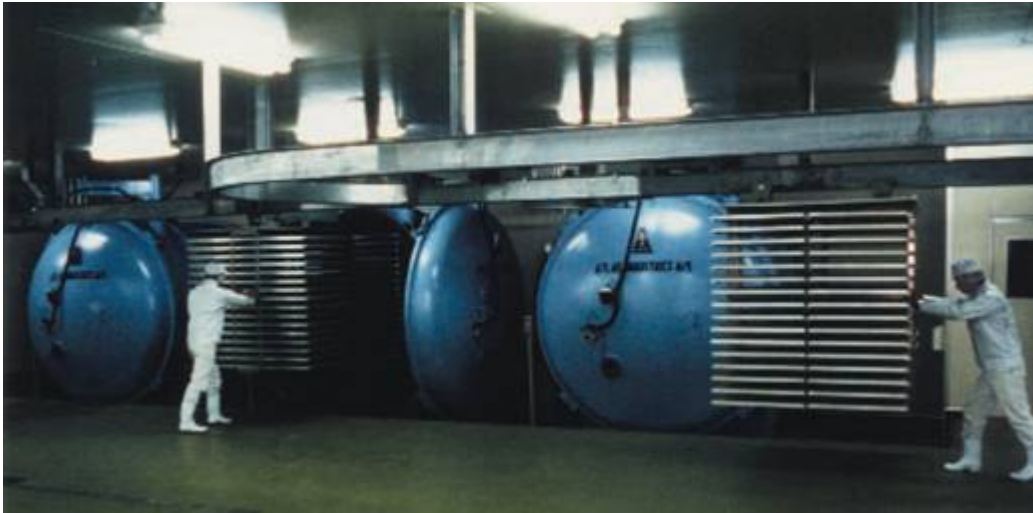


The carts then go to a vacuum drying
chamber, where 98% of the water from
the food is removed.

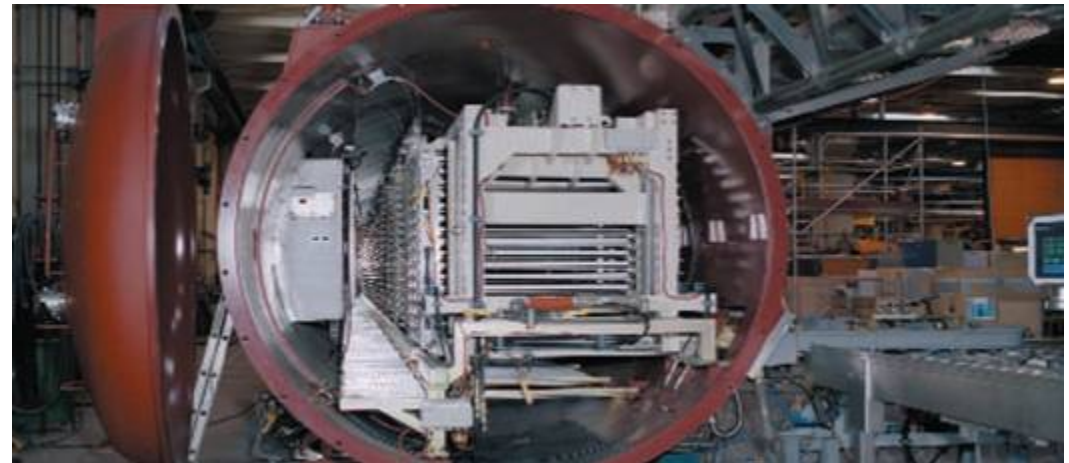


CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL





Liofilización en batch



Liofilización continua

Los estados de agregación del agua: Diagrama de fases.

Los diagramas de fases muestran en forma simple las regiones de presión y temperatura en las que predomina cada fase como también las zonas donde coexisten en equilibrio dos o tres fases (punto triple).

El diagrama denota la presión ejercida por las moléculas de agua a una dada temperatura.

La energía intermolecular determina los cambios energéticos en las transiciones de fase.

Varios cambios en el estado del agua son importantes en la liofilización:

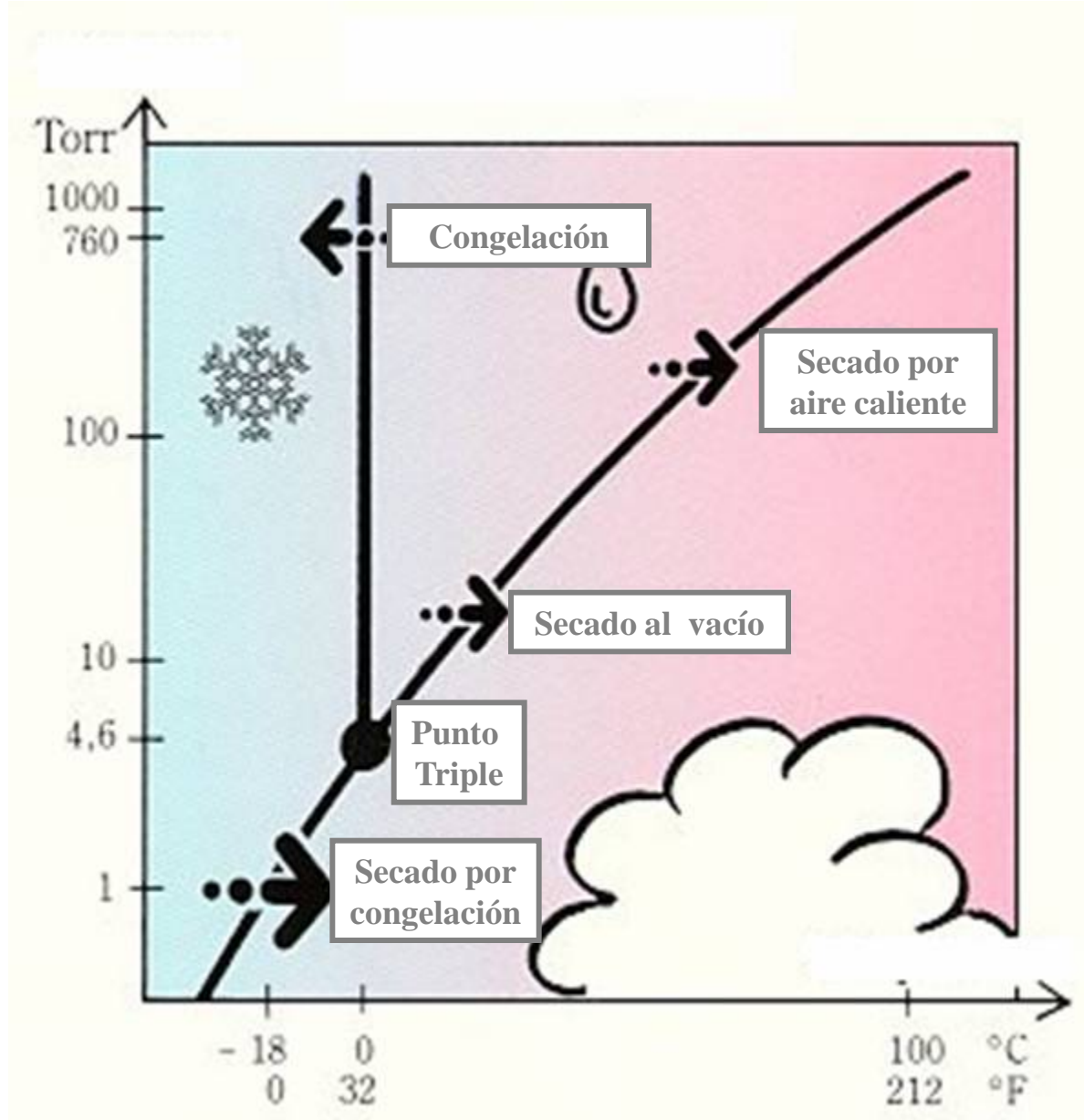
Uno es la congelación del agua (líquido/sólido)

Otro es sublimación (sólido/vapor).

La transferencia de energía requerida para los cambios es distinta:

Para congelar 1g de agua se requiere extraer 80 cal. Mientras que para sublimar hielo se requiere aportar 680 cal.

Diagrama termodinámico del agua



Presión de aire a distintas altitudes

Feet	Torr	Meters	mBar
0	760.0	0	1013.3
2000	704.1	609.6	938.8
4000	652.4	1219.2	869.8
6000	604.4	1828.8	805.9
8000	560.0	2438.4	746.6
10000	518.9	3048	691.8
12000	480.7	3657.6	640.9
14000	445.4	4267.2	593.8
16000	412.7	4876.8	550.2
20000	354.2	6096	472.3
22000	328.2	6705.6	437.6
24000	304.1	7315.2	405.4
26000	281.7	7924.8	375.6
30000	241.8	9144	322.4

Si vemos el diagrama de fases del agua el punto triple está a 4,6 Torr

Las aplicaciones comerciales emplean 100 mTorr o 0,1333 mBar, claramente < que la P de aire en los Andes.

¿Cómo podían liofilizar los Incas?

Ojo: a 0°C el punto de 100% R.H. es 5,3 Torr (7,067 mBar), y la H.R. tiene que estar por debajo de 86,4% a 0°C para que comience la sublimación.

Por esto, la condición de sublimación debe ser “una reducción en la **presión parcial de agua de manera que sea sustancialmente menor que la presión de saturación a la dada temperatura”.**

Esta condición usualmente se alcanza bajando la P, pero sólo es necesario disminuir la PV de agua para alcanzar el requerimiento.

Para una velocidad adecuada de sublimación, la p_v de H_2O tiene que ser < 200 mTorr (0.2 Torr). Durante la sublimación en una cámara evacuada la p_v total (100%) está dada por las moléculas de agua.

Entonces si la P en el manómetro es 200 mTorr, esa es la p_v de agua. Es sólo alrededor de 22 veces menor que la p_v de la atmósfera.

Como generalmente la congelación de agua ocurre a presión atmosférica, la temperatura del cambio de fase del estado líquido sería el punto de congelación de agua (0°C) si se tratara de agua pura, pero la presencia de sólidos afecta la temperatura a la cual ocurrirá la congelación.

Además del diagrama P, T analizado para el agua pura, nos interesa el diagrama temperatura-composición a presión atmosférica (diagrama T-X a 1013 hPa) .

Ciclo de liofilización:

Preparación del material.

• **Congelación** (todos los fluidos se solidifican: pueden ser cristalinos, amorfos o vítreos). Se genera un red compleja de hielo, que puede estar embebida en estructuras vítreas o permanecer asociada a estructuras intersticiales. Ojo con estrés mecánico por expansión volumétrica. Se realiza en ciclos de enfriamiento/calent..

• **Sublimación: secado primario.** El material congelado se coloca al vacío. Debe haber un balance adecuado entre el calor que se le provee (transf. de calor) y el agua que sublima (transf. de masa) para que no haya colapso. Desafío: entregar energía en el vacío. Importante ajustar la presión para manejar la posibilidad de sublimación.

Ciclo de liofilización:

- **Desorción: secado secundario** (comienza cuando se ha sublimado todo el hielo). Para cada producto se establece un rango de contenido de agua remanente.
- **Acondicionamiento final:** para extararlo de la cámara: cuidados con el aire que ingresa, humedad ambiente, luz, oxígeno, sellado.
- **Reconstitución del producto:** temperatura y solvente, procedimiento.

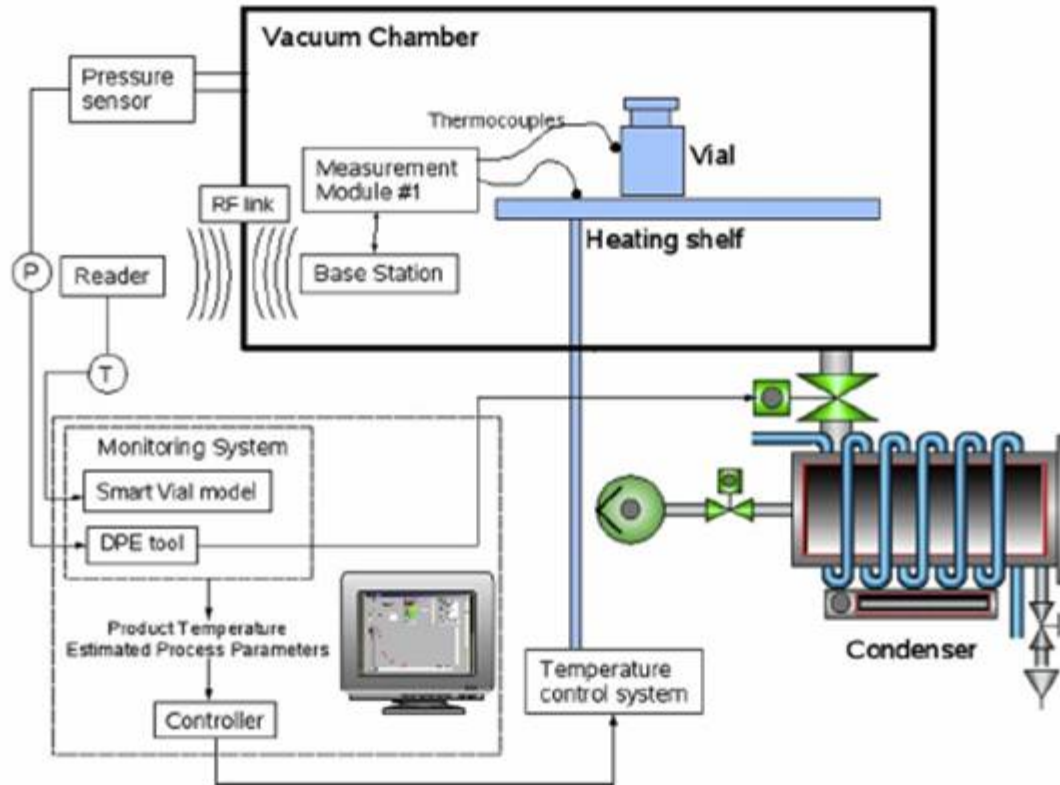
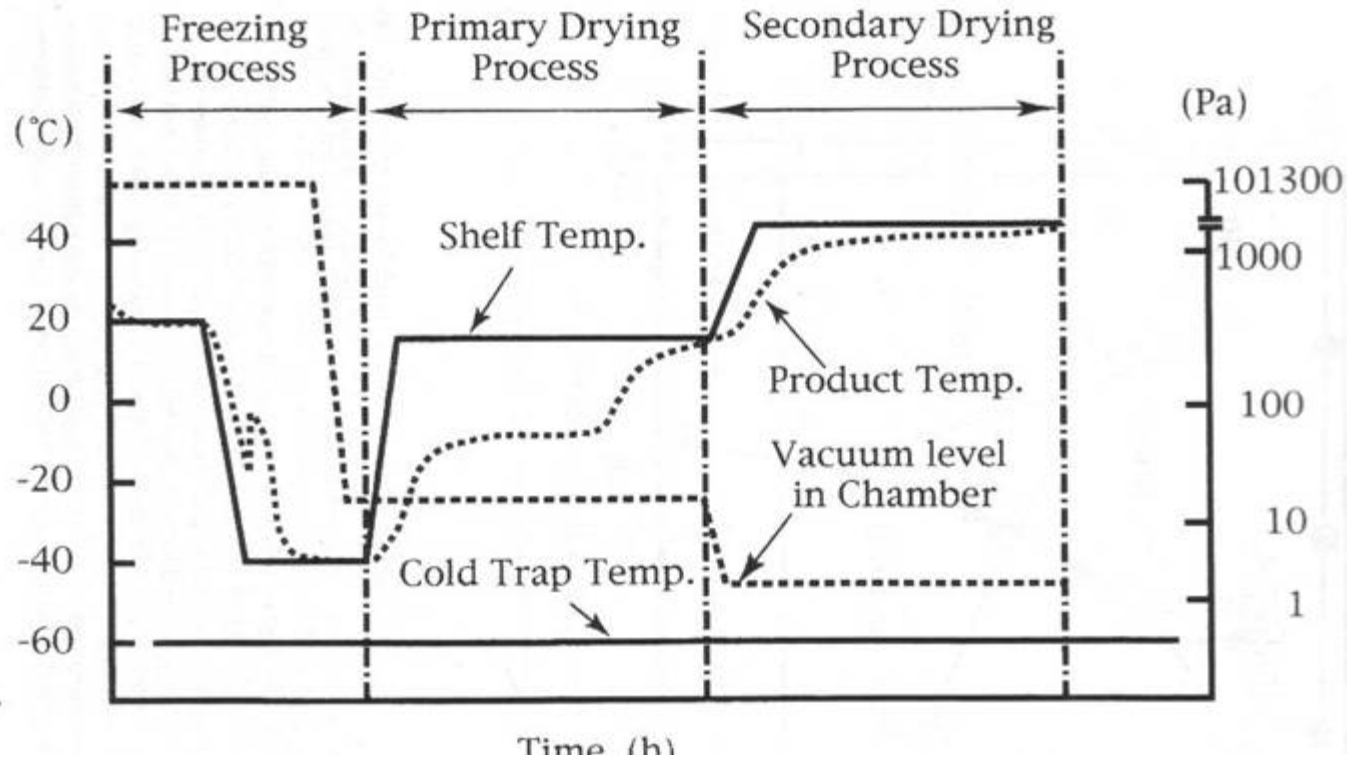
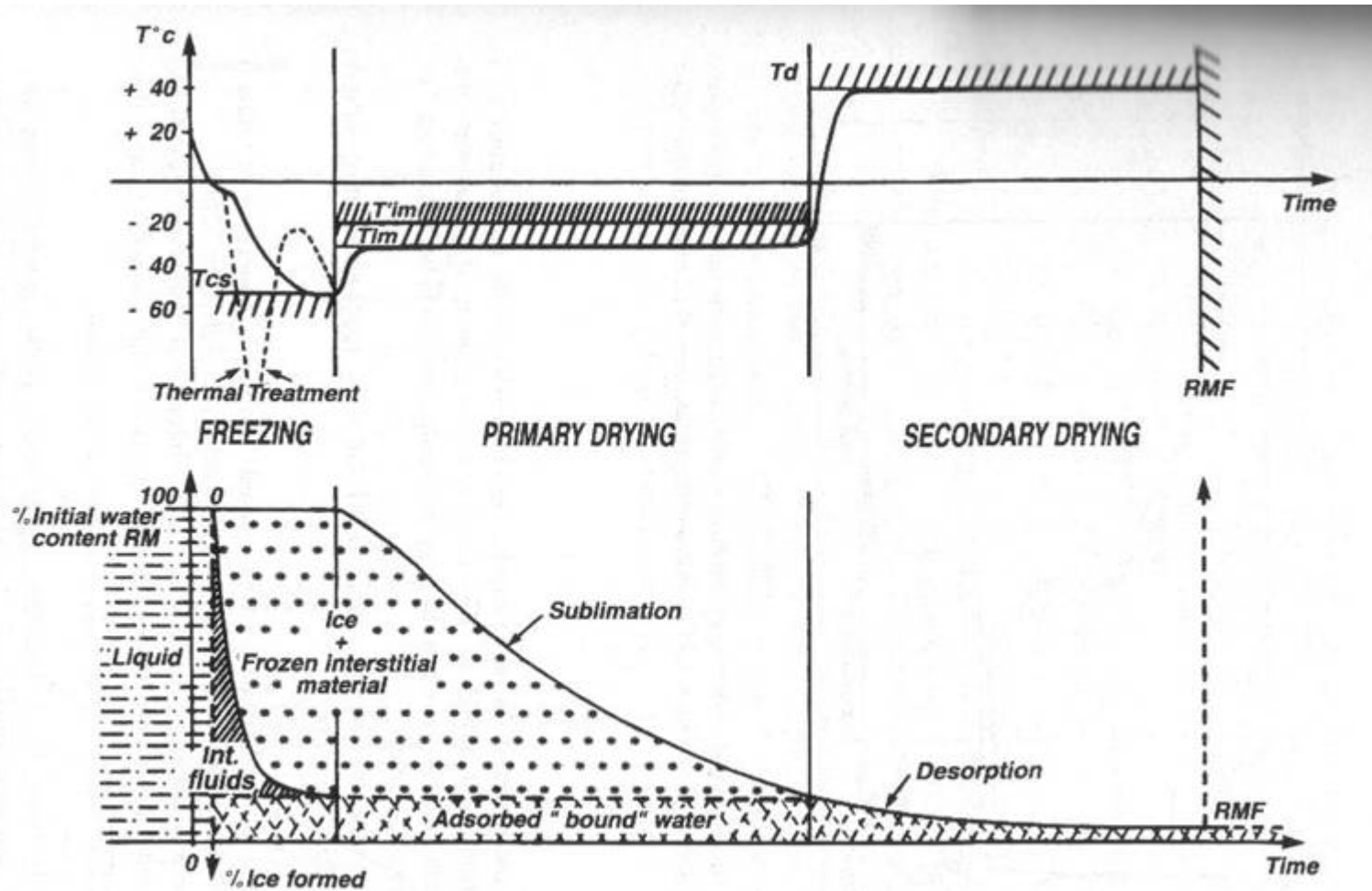


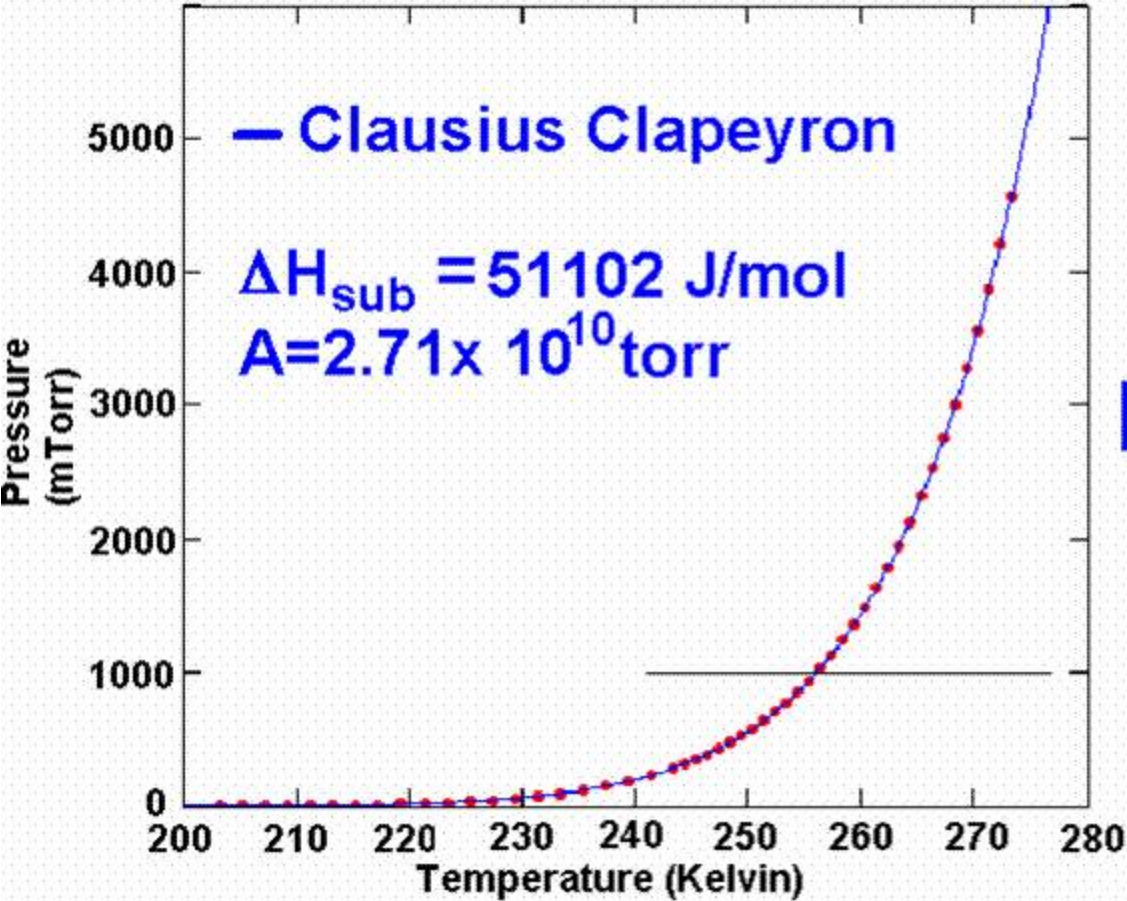
Fig. 4 – Scheme of the monitoring and control system for the freeze-drier, including both the *smart vial* observer and the *Dynamic Parameters Estimation (DPE)* tool based on pressure rise tests. The architecture of the special thermometer with the wireless transmission system is also shown.



Ejemplo de un programa para liofilización de inyectables.



Saturated Vapor Pressure Over Ice



$$P = A \cdot e^{\left[\frac{-\Delta H_{\text{sub}}}{R \cdot T} \right]}$$

Permite calcular la pv de agua sobre hielo.

ΔH depende de T en la Fig. está para $T = -40^\circ\text{C}$ (tabla).

Los parámetros del **material** y del **proceso** determinan que una liofilización sea exitosa.

Las propiedades termoquímicas y termomecánicas de los materiales solubles amorfos forman la base de un diseño efectivo de formulación y las aproximaciones coordinadas para la formulación y el desarrollo de proceso permiten alcanzar óptimos resultados con un mínimo de prueba-error.

Equivalencias de unidades de presión

	Atm	Bar	Torr	mbar	Pascal	$\mu\text{m Hg}$
Atmósferas	1	1,013	760	1013	101308	760000
Bar	0,987	1	750,12	1000	100000	750120
Torr	0,00132	0,00129	1	1,33	133,3	1000
Milibar	0,000987	0,001	0,75	1	100	750
Pascal	0,00000987	0,00001	0,0075	0,01	1	7,5
Micrómetros (micrones)	0,00000132	0,00000129	0,001	0,00133	0,133	1

Para que ocurra sublimación en la interfase entre la capa congelada la energía requerida para la transformación sólido-vapor debe ser transportada a través de la muestra hasta la interfase. Esto requiere gradientes de temperatura, cuya magnitud dependerá de las resistencias al transporte de calor presentes en el producto.

La capa congelada tiene mucho menor resistencia al transporte de calor que la capa seca y por lo tanto se requiere mucho menor gradiente de temperatura a través de la capa congelada que a través de la capa seca.

Análisis del comportamiento en congelación.

J. Xiang et al. / International Journal of Pharmaceutics 279 (2004) 95–105

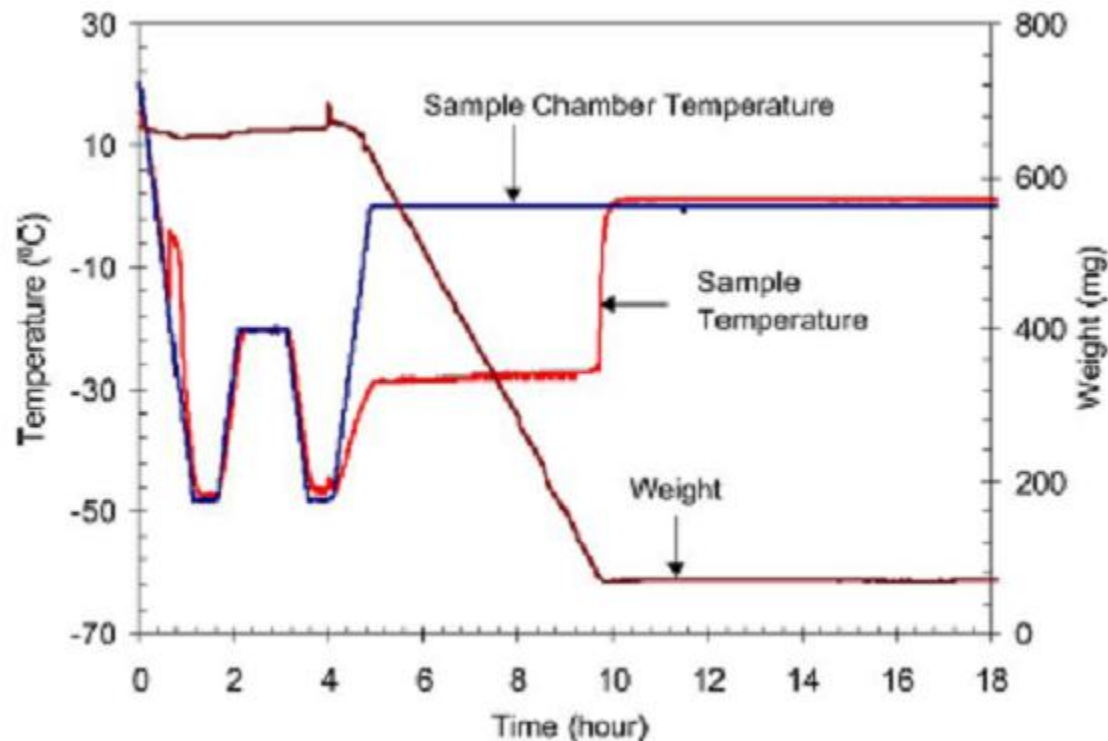


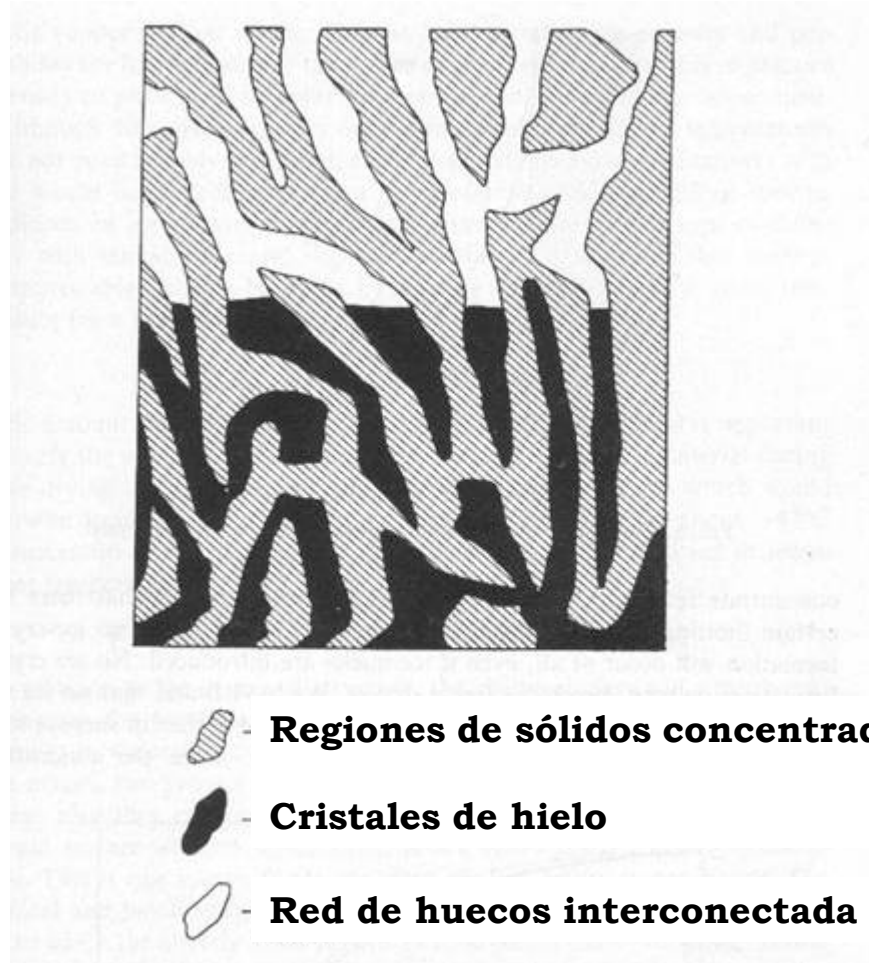
Fig. 5. A typical freeze-drying cycle using the freeze-drying microbalance.

Velocidad congelación	Número y tamaño cristales	Estructura del material	Deseccación primaria	Deseccación secundaria
--------------------------	---------------------------------	----------------------------	-------------------------	---------------------------

Lenta	Pocos y grandes	Poros grandes	Más rápida	Desorción más lenta
-------	--------------------	------------------	------------	------------------------

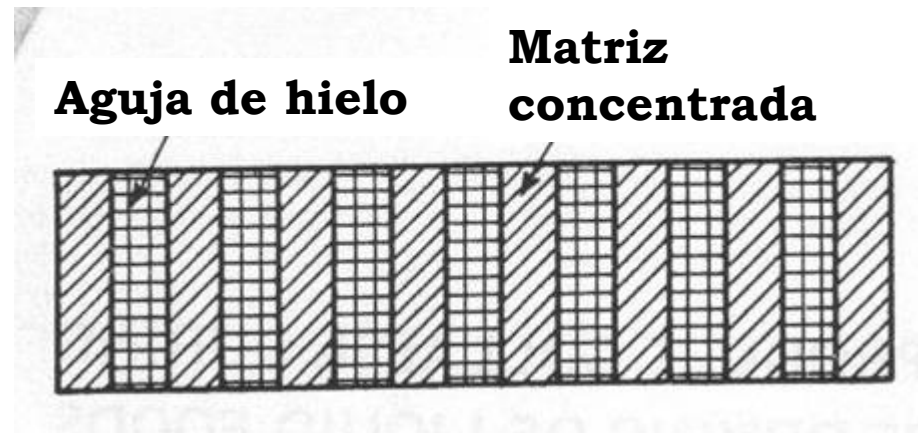
Rápida	Numerosos y pequeños	Poros pequeños y mayor superficie específica	Más lenta	Desorción más rápida
--------	-------------------------	--	-----------	-------------------------

Segregación de hielo y concentrado durante la liofilización de soluciones.



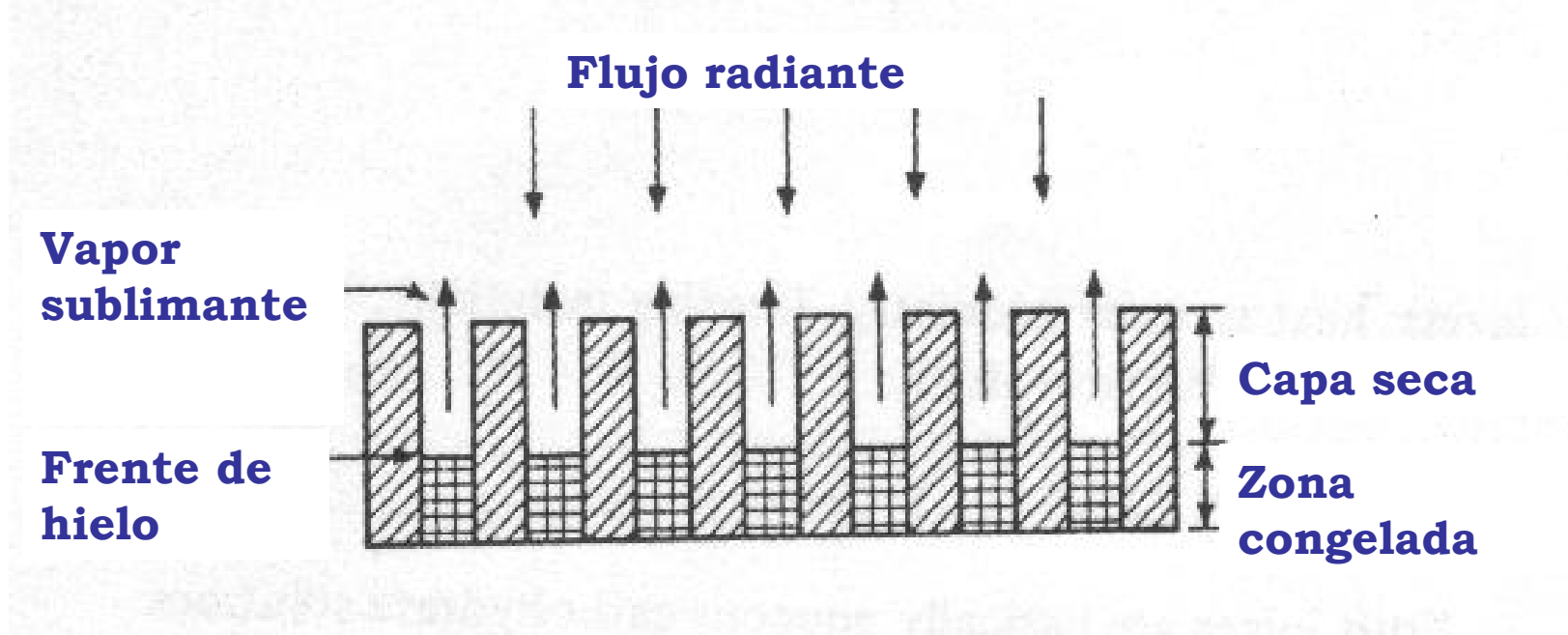
Queda una matriz porosa luego de la remoción de hielo por sublimación

La congelación causa la microseparación de una solución acuosa en una mezcla de agujas de hielo y sólidos cristalinos o solución amorfa concentrada, en la que permanecen las sustancias activas.



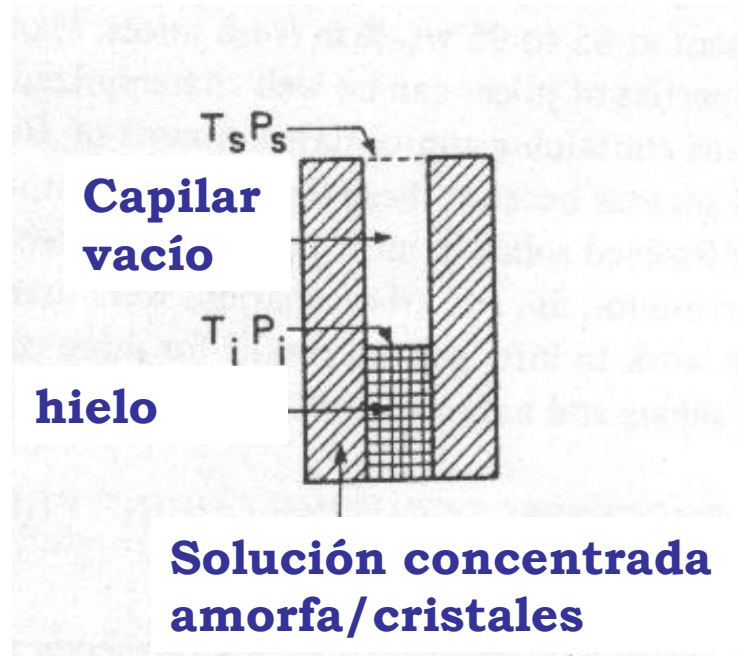
Sección ideal de un líquido congelado
Microestructura unidireccional.

En la cámara de vacío se entrega el calor latente para que ocurra la sublimación:



Primero sublima el hielo cerca de la superficie, dejando un frente uniforme de hielo a cierto nivel dentro del material.

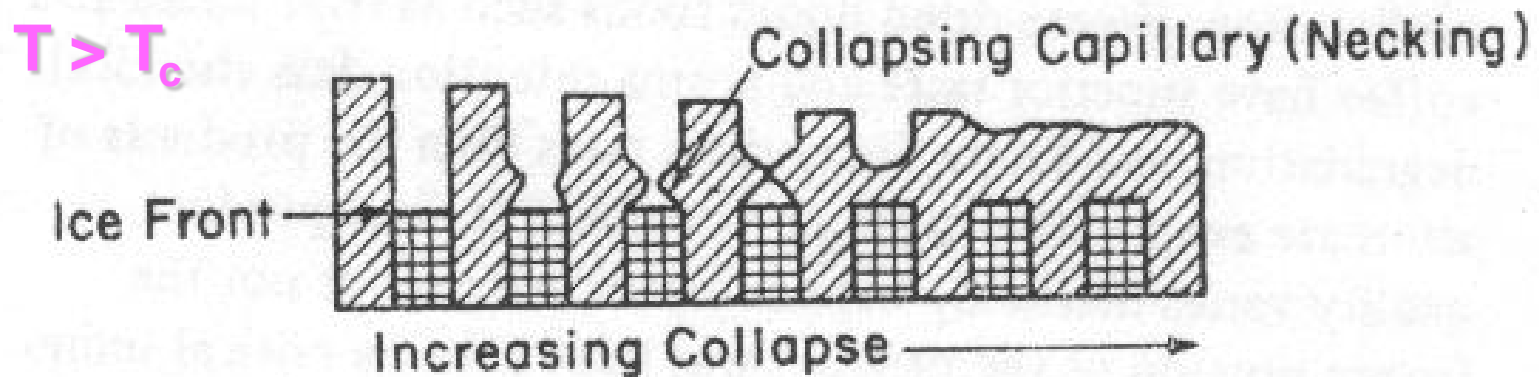
La región por debajo del frente de hielo es la zona congelada. El calor de sublimación se entrega al frente de hielo por conducción a través de la capa seca.



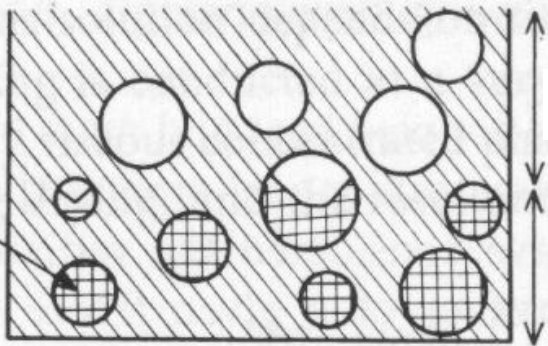
El vapor sublimado deja el frente de hielo a través de los capilares que dejan las agujas de hielo sublimado previamente.

La superficie externa del material debe mantenerse por debajo de la temperatura del frente de hielo para que ocurra esta transferencia de calor.

La velocidad de secado está limitada por la velocidad a la cual el vapor puede difundir del frente de hielo. Elevando la temperatura del frente de hielo aumenta la velocidad de transferencia de masa, pero esto está limitado por una temperatura crítica del material, por encima de la cual los capilares se estrangulan:



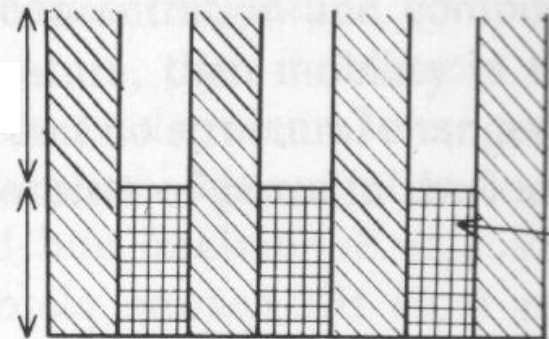
hielo



Capa seca

Capa cong.

A través de la matriz

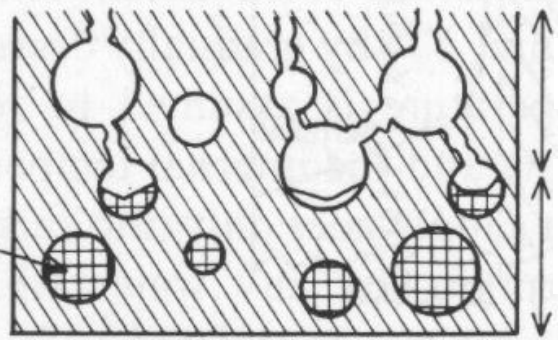


hielo

A través de canales

Representación de distintas formas de flujo de vapor en la liofilización

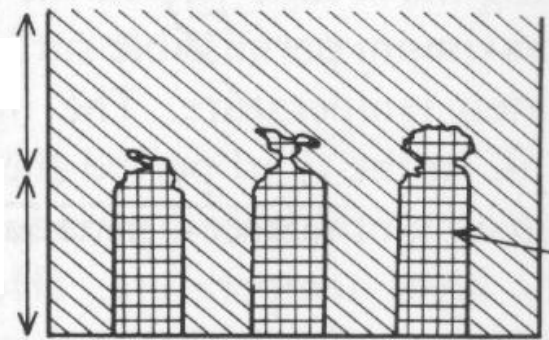
hielo



Capa seca

Capa cong.

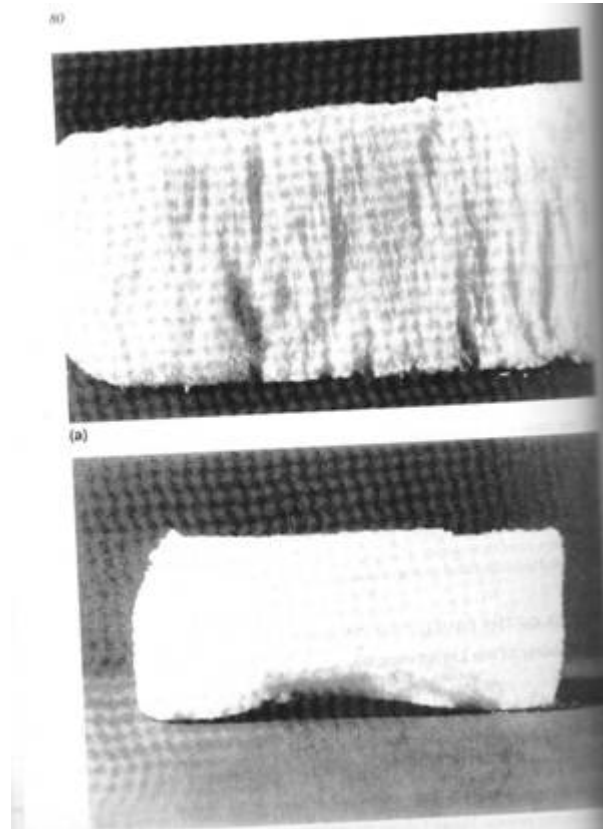
A través de grietas



hielo

Colapso en el frente de hielo

Efecto del contenido inicial de sólidos



**Solución de
proteína 10%**

**Solución de
manitol 5%**

**Si el contenido de sólidos es bajo (<2%) el
producto seco no es mecánicamente estable**

La **temperatura de colapso** de la muestra (T_c) es el punto en el cual el ablandamiento progresa causando colapso estructural de la torta secada, un fenómeno que puede estudiarse por microscopía de liofilización (FDM).

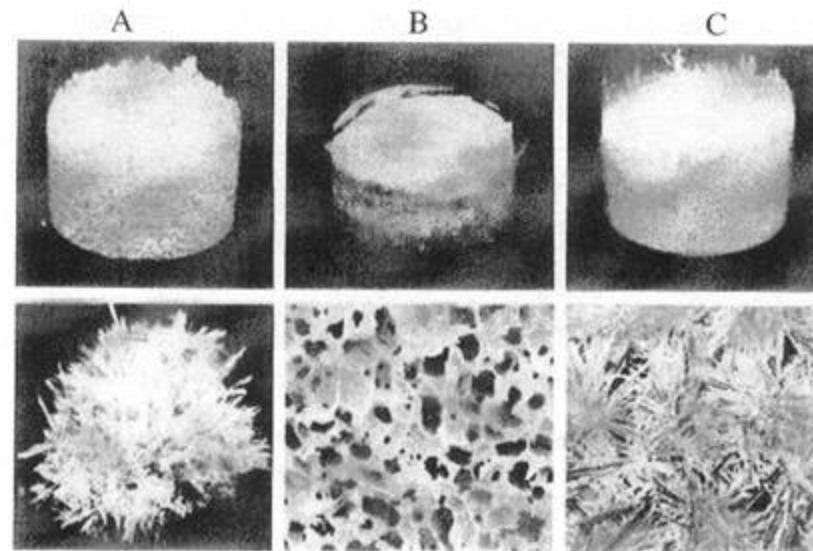
Para un sistema **que cristaliza** el colapso ocurre cuando se excede el menor punto eutéctico de fusión (T_{eu}).

Para un sistema que **no cristaliza** la T_c está determinada por la temperatura de transición vítrea del sistema (T_g).

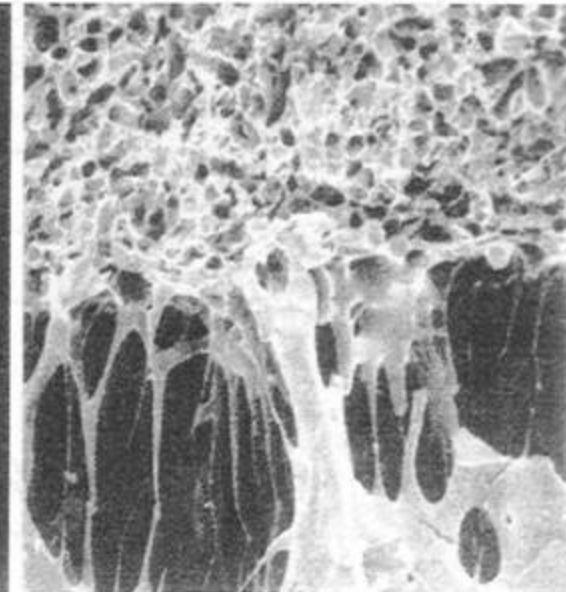
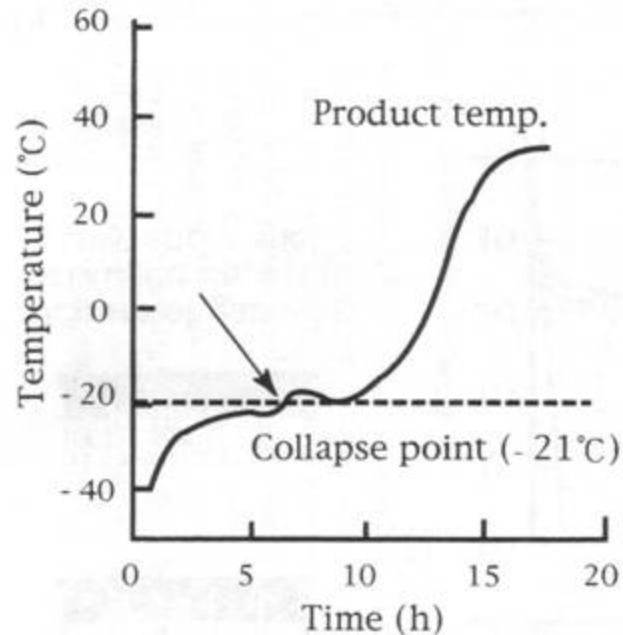
Cristalización granular.

No cristalina

Con sembrado de cristales

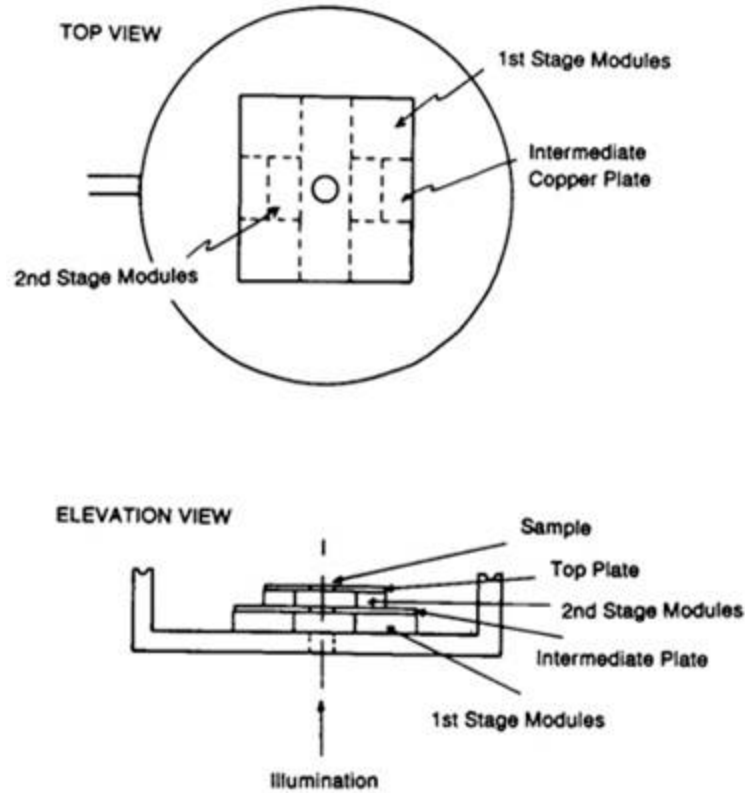


Distinta estructura de un producto, de acuerdo con las condiciones de cristalización.

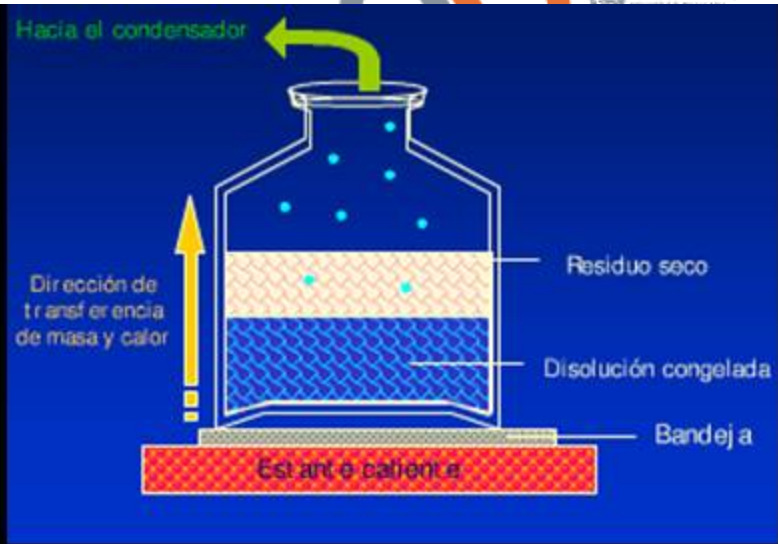


Colapso durante el secado primario. Se empleó una solución 15% de LMOX (latamoxef) y una temperatura de estante de 40°C, con vacío de 10Pa en la cámara

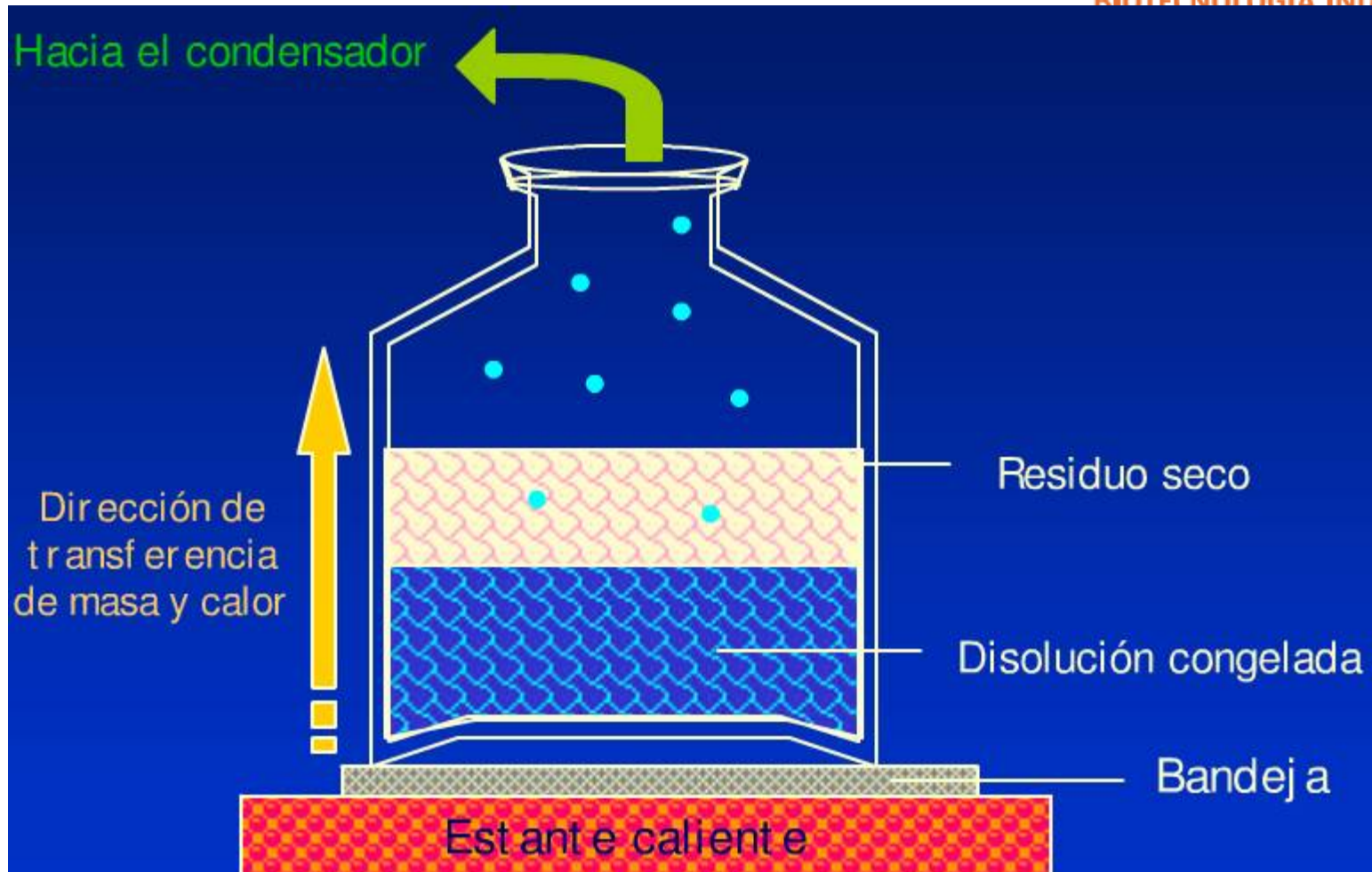
Controlador termoelectrico para liofilización microscópica

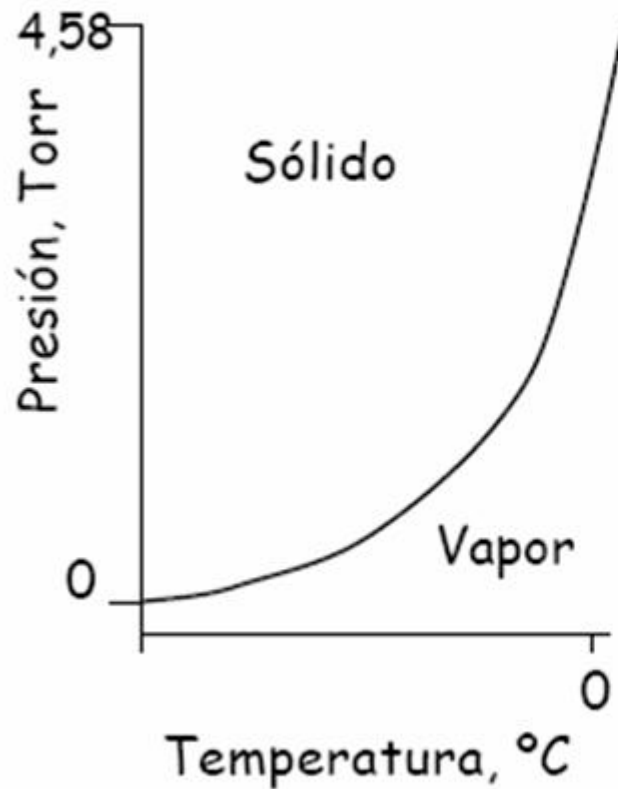


Permite la observación directa del eutéctico.



Avance del frente de hielo en el secado primario





Presión de vapor del hielo

Temperatura, °C	Presión, Torrs
0	4,579
-18	0,939
-20	0,776
-40	0,0966
-60	0,0080
-80	0,0004

Transporte de calor

Desde la fuente de calor a la superficie se realiza por radiación.

Desde la superficie hasta la interfase a través de la capa seca ocurre principalmente por conducción.

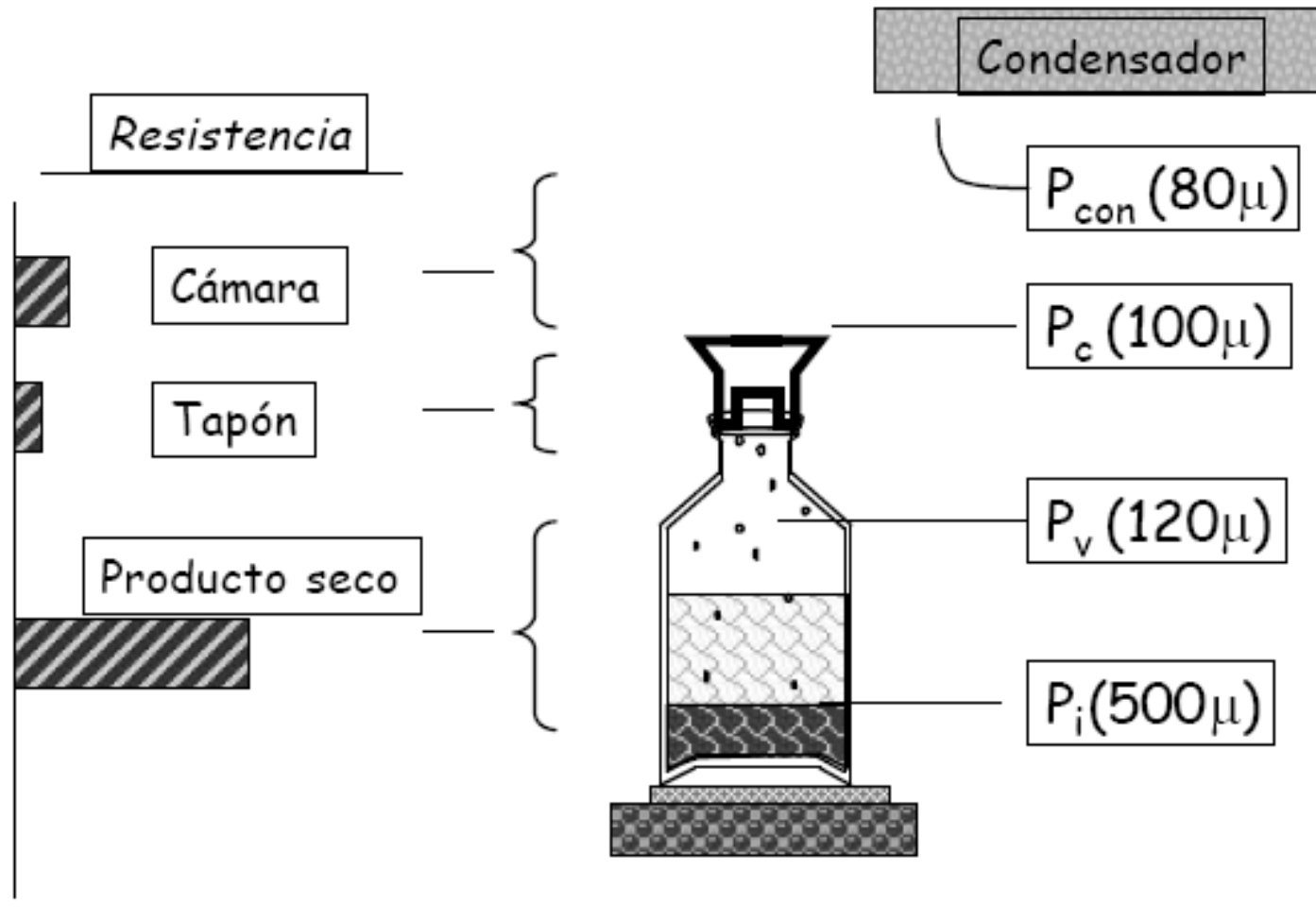
A través de la capa congelada ocurre por conducción.

Desde la fuente de calor hasta la capa congelada depende del diseño, puede ser por conducción.

Condensador



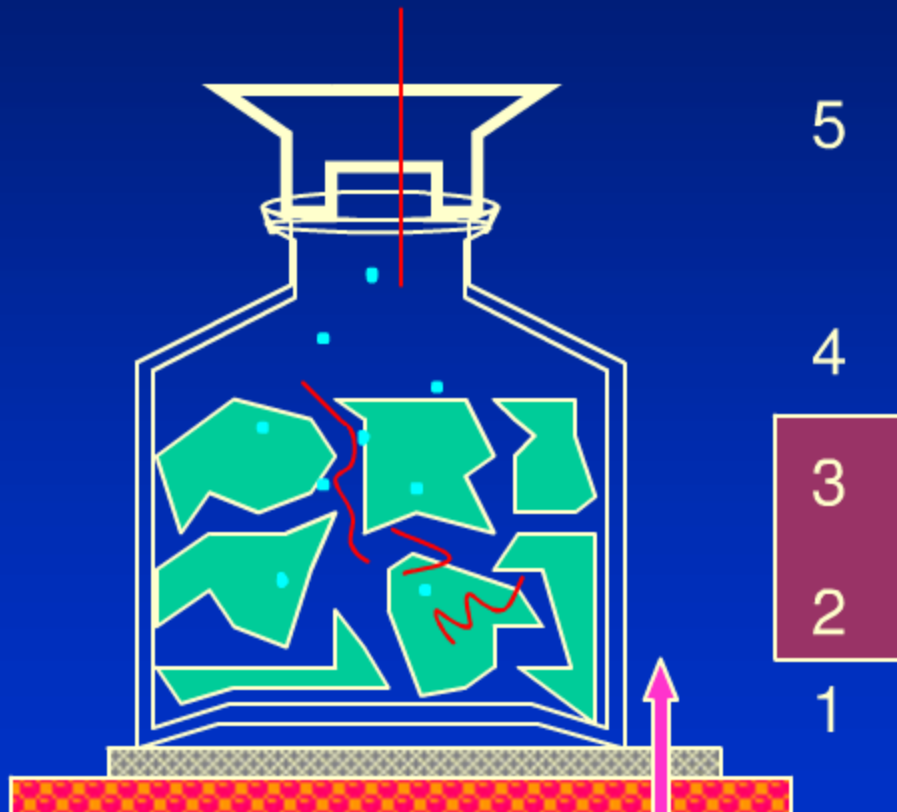
- 6 Transferencia térmica
- 5 Condensación
- 4 Transferencia de vapor hasta el condensador
- 3 Transferencia de vapor en el material poroso
- 2 Sublimación
- 1 Transferencia térmica



Pasar a Pa!

Material	Conductividad Térmica (cal*cm/cm ² *h*°C)	Resistencia (cm ² *h*°C/cal)
Hielo (0,79cm)	18,4	4,3*10 ⁻²
Cristal (0,2cm)	9,4	2,1* 10 ⁻²
Aluminio(0,4cm)	2581	1,55* 10 ⁻⁴
Global		6,4*10 ⁻²

Condensador



El flujo de vapor de agua es impedido por tres

barreras de resistencia:

- **Resistencia de la capa seca del producto**
- **Resistencia de los viales semitapados**
- **Resistencia de la cámara.**

La relación entre flujo de calor y diferencia de temperatura puede describirse por un coeficiente de transferencia de calor del vial que tiene contribuciones de tres mecanismos paralelos:

- **Conducción directa del estante al vial a través de los puntos de contacto directo**
- **Conducción a través del vapor entre el fondo del vial y el estante, y**
- **Flujo de calor radiante.**

Acoplamiento de transportes de calor y masa

Como todo el vapor que se forma, determinado por el transporte de calor, debe ser extraído, la presión de agua en la interfase se establecerá a un nivel relativo a la presión del condensador .

De esta manera, el transporte de masa resultante desde la interfase balancea la velocidad de formación de vapor determinado por el transporte de calor.

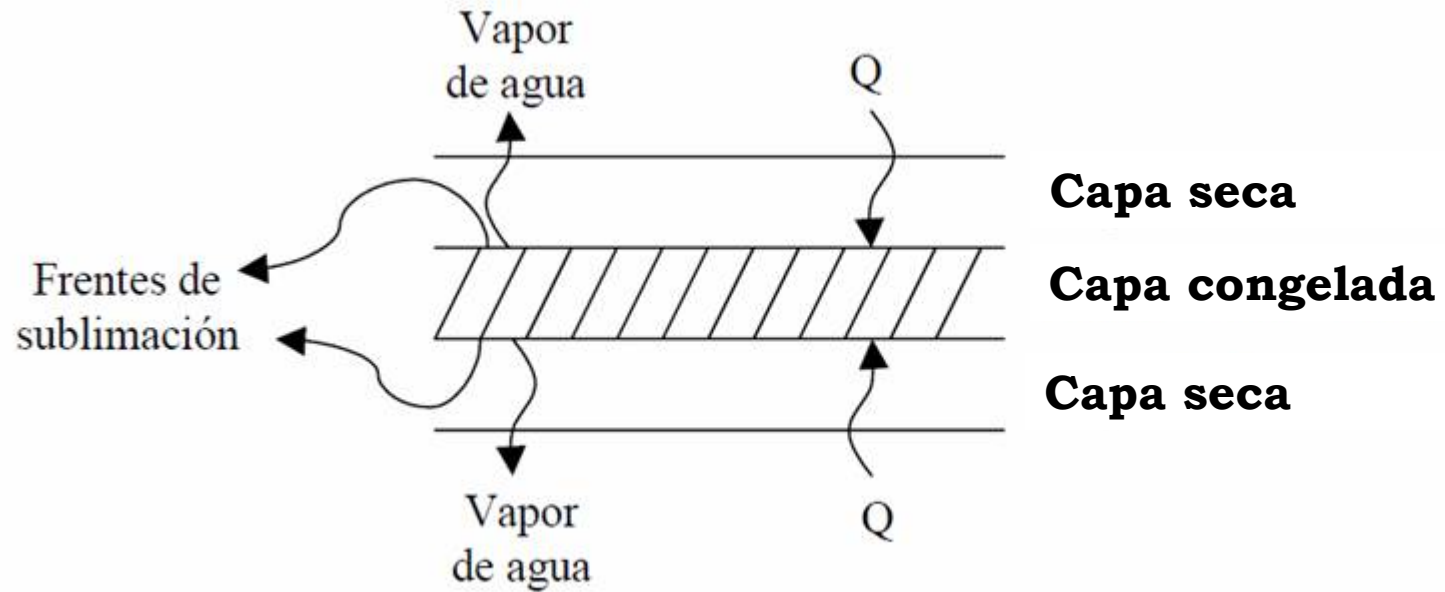
Transporte de calor y de masa en la liofilización

Veloc. de transporte =

Área*fuerza impulsora/resistencias

Suposiciones:

- **T_s (T° de la superficie sólido) permanece constante.**
- **Material se seca por un lado.**
- **T° calor interior sólidos \longrightarrow conducción**
- **Vapor de agua \longrightarrow difusión**
- **Todo el calor se va $\longrightarrow \lambda$**



1.- Transferencia de masa (vapor de agua) proveniente del frente de sublimación, por difusión (removida por el condensador).

$$\frac{dx}{dt} = b \cdot A \cdot \frac{(P_i - P_s)}{e}$$

donde,

$\frac{dx}{dt}$ es el flujo másico de vapor a través de la capa seca (kg vapor/s)

b es la permeabilidad de la capa seca con respecto al transporte de vapor (kg/m.s.Pa)

P_i es la presión de vapor en el frente de sublimación (Pa).

P_s es la presión de vapor de agua en la superficie de la capa seca (Pa).

e es el espesor de la capa seca (m).

A es el área efectiva de sublimación (m²)

2.- Transferencia de calor por conducción.

$$\frac{dQ}{dt} = K_d \cdot A \cdot \frac{(T_s - T_i)}{e}$$

donde,

e, espesor de la capa seca (m)

Kd conductividad térmica de la capa seca (J/s·m·K)

Ts es la temperatura de la superficie de la capa seca (°C)

Ti es la temperatura del hielo en el frente de sublimación (°C).

En condiciones de estado estacionario

$$\left(\begin{array}{l} \text{velocidad} \\ \text{transmisión del calor} \\ \text{por conducción} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{l} \text{velocidad} \\ \text{transferencia de vapor} \\ \text{por difusión} \end{array} \right)$$

$$\frac{dQ}{dt} = \lambda \cdot \frac{dx}{dt}$$

donde,

$$\frac{K_d \cdot A \cdot (T_s - T_i)}{e} = \lambda \cdot \frac{A \cdot b \cdot (P_i - P_s)}{e}$$

obteniéndose una expresión que nos relaciona ambas fuerzas impulsoras:

$$\boxed{K_d \cdot (T_s - T_i) = \lambda \cdot b \cdot (P_i - P_s)}$$

En el caso de un sólido de forma plana que se liofiliza por una de las caras, suponiendo que el contenido de humedad de la capa seca es X_e (kg agua/kg sólido seco) y que el frente de hielo retrocede formando un plano uniforme, la velocidad de desecación dx/dt es:

$$-\frac{dx}{dt} = A \cdot \rho_s \cdot \frac{de}{dt} (X_o - X_e)$$

donde,

ρ_s es la densidad de sólido seco.

X_o es el contenido inicial de humedad (base seca).

Por lo tanto resulta:

$$-\frac{dx}{dt} = A \cdot \rho_s \cdot (X_o - X_e) \cdot \frac{de}{dt} = \frac{K_d \cdot A \cdot (T_s - T_i)}{\lambda \cdot e} = \frac{A \cdot b \cdot (P_i - P_s)}{e}$$

Por lo tanto resulta:

$$-\frac{dx}{dt} = A \cdot \rho_s \cdot (X_o - X_e) \cdot \frac{de}{dt} = \frac{K_d \cdot A \cdot (T_s - T_i)}{\lambda \cdot e} = \frac{A \cdot b \cdot (P_i - P_s)}{e}$$

integrando la segunda y tercera ecuación:

$$t=0 \rightarrow e=0;$$

$$t=t \rightarrow e=e,$$

obtenemos el tiempo de liofilización:

$$t = \frac{\lambda \cdot \rho_s \cdot (X_o - X_e) \cdot e^2}{2 \cdot K_d \cdot (T_s - T_i)}$$

(si el secado procede por ambas caras es (e/2))

El tiempo del secado primario puede expresarse también en función de la diferencia de presión de vapor de agua en la interfase hielo/capa seca y la presión de vapor de agua en la superficie de la capa seca

$$t = \frac{\rho_s \cdot (X_o - X_e) \cdot e^2}{b \cdot K_d \cdot (p_i - p_s)}$$

(si el secado procede por ambas caras es $(e/2)$)

Por lo tanto el tiempo de secado depende de las siguientes variables:

Máxima temperatura permisible, T_s

Contenidos de agua inicial y final X_o , X_e

Entalpía de sublimación, λ

Espesor de la muestra, e

Conductividad térmica de la capa seca, K_d

Para un dado producto distribuido en viales el tiempo del secado primario puede minimizarse haciendo la diferencia de temperatura entre el estante y el hielo lo más grande posible.

El control de la temperatura de los estantes es lenta por que la capacidad calorífica del medio de transmisión es grande.

Es más fácil controlar la presión.

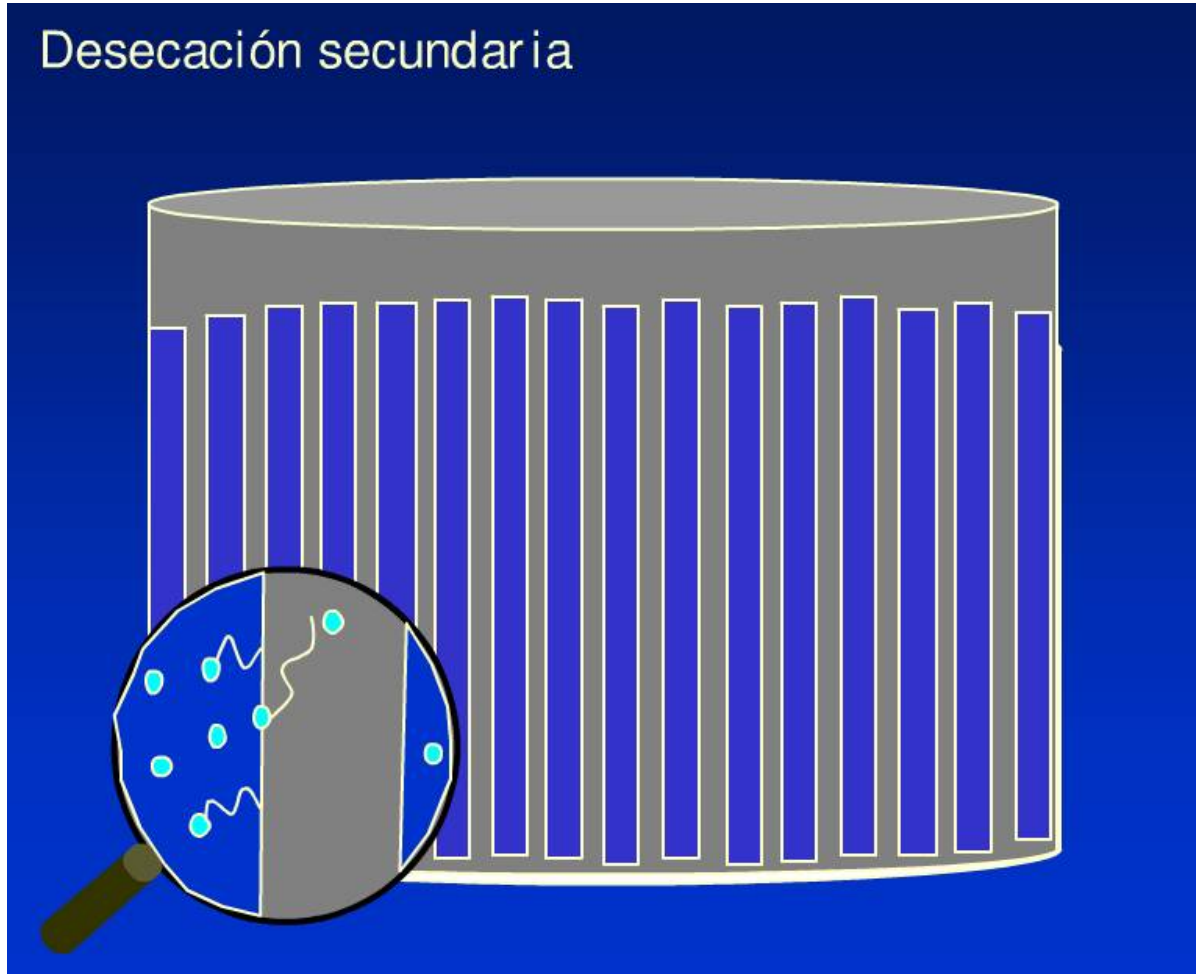
La temperatura del hielo está determinada por interacciones entre la temperatura de la superficie, la presión de la cámara y las propiedades de la capa seca, k .

La temperatura de la capa congelada debe mantenerse por debajo de una T crítica que depende de la naturaleza del producto.

Secado secundario

- Involucra la remoción del agua remanente en el producto, que no se separó como hielo durante la congelación de y por lo tanto **no sublimó**.
- Es difícil transferir energía en una matriz porosa colocada al vacío, ya que se comporta como un material insuflado perfecto.
- Por lo tanto, el secado secundario lleva tanto tiempo como la etapa del secado primario, aunque durante esta etapa se separa mucho menos agua.

Desecación secundaria



Al final del proceso de sublimación el agua puede estar:

- **Retenida en capilares**
- **Adsorbida a grupos polares**

Debido a su baja presión de vapor se elimina con dificultad.

Generalmente:

Se aumenta la temperatura hasta el límite tolerable del producto seco

O se genera alto vacío alrededor del producto.

1. Disminución de la temperatura del condensador

Ej de -50°C (0,04 mbar) a -80°C (0,0005mbar)

Esta disminución de presión es relativamente pequeña cuando se la compara con la presión de saturación de agua en la muestra (0,023 mbar a 20°C). Mientras una disminución de presión en el condensador parecería permitir una menor presión de vapor de agua, casi no tiene efecto.

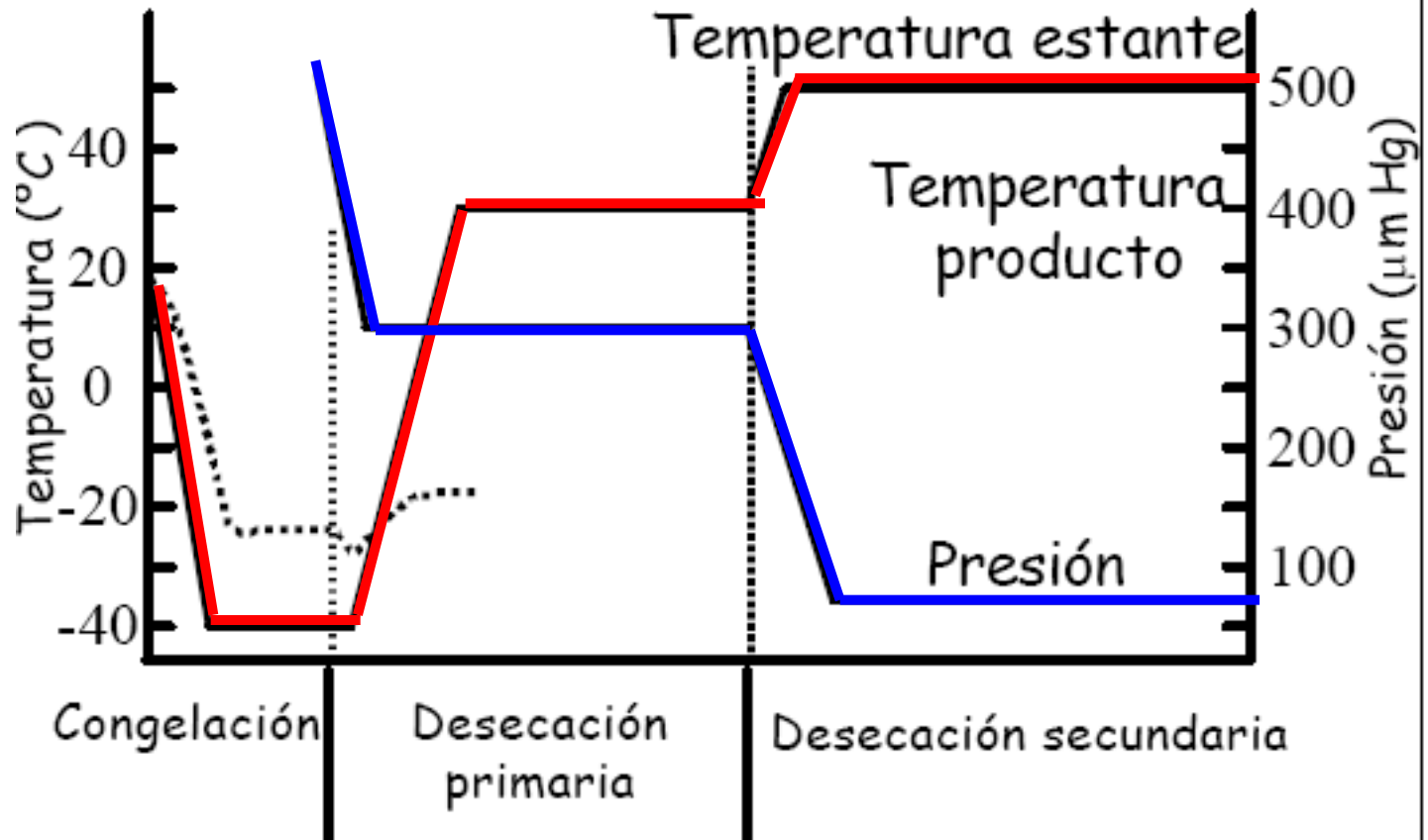
2. Aumento de la temperatura de la muestra

Ej de -20°C a 30°C


resulta en un aumento de la presión de saturación de 23,3 mbar a 42,3 mbar, lo que significa casi el doble de gradiente.

En este caso hay que tener en cuenta consideraciones de estabilidad mecánica y química de las muestras.

Debe encontrarse un compromiso ya que el material poroso es aislante, muy alto vacío provoca un gradiente de temperatura muy alto entre la superficie y el centro y una temperatura lo más uniforme posible asegura una desorción más pareja.



Aspectos que deben considerarse:

- 1. Diagramas de estado suplementados.** 
- 2. Congelación.**
- 3. El proceso.**
- 4. Caracterización del producto: sorción de agua y de nitrógeno.**
- 5. La estabilidad del producto.**

El agua y los sólidos del material determinan cómo se va a comportar la muestra durante el proceso.

A través de **diagramas de estado suplementados** se pueden seleccionar condiciones de proceso (incluyendo congelación) o establecer formulaciones óptimas.

La **estabilidad** del producto dependerá de todas las consideraciones previas.

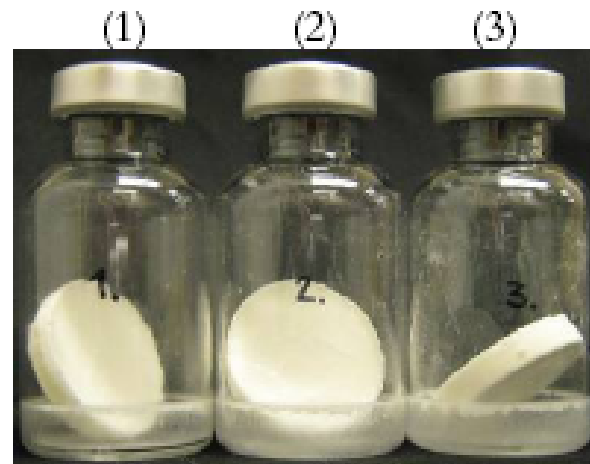
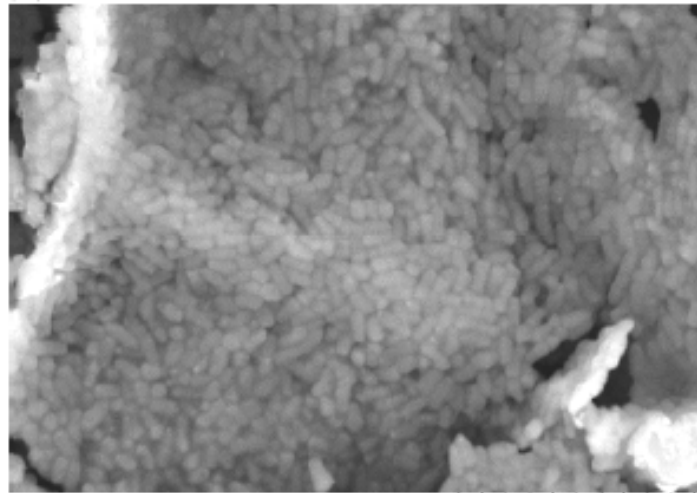


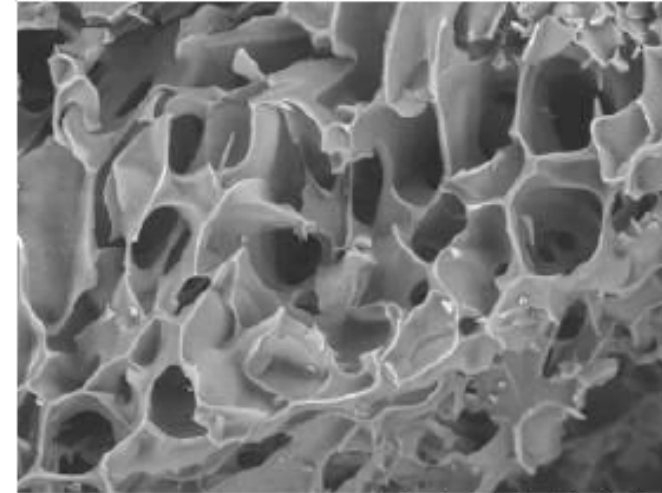
Figure 12. Freeze-dried cakes stored under appropriate storage conditions (*i.e.* low moisture levels and low temperature) for three months. The samples are 10^{10} CFU/mL *Lb coryniformis* Si3 with, from left (1) 15% sucrose; (2) 15% sucrose and 2.5% PVP90; and (3) 15% sucrose and 2.5% Ficoll400. The cakes are of approximately the same volume as the liquid formulation prior to drying.

(a)



TM-1000_1057 2008-09-10 14:12 L 10 μm

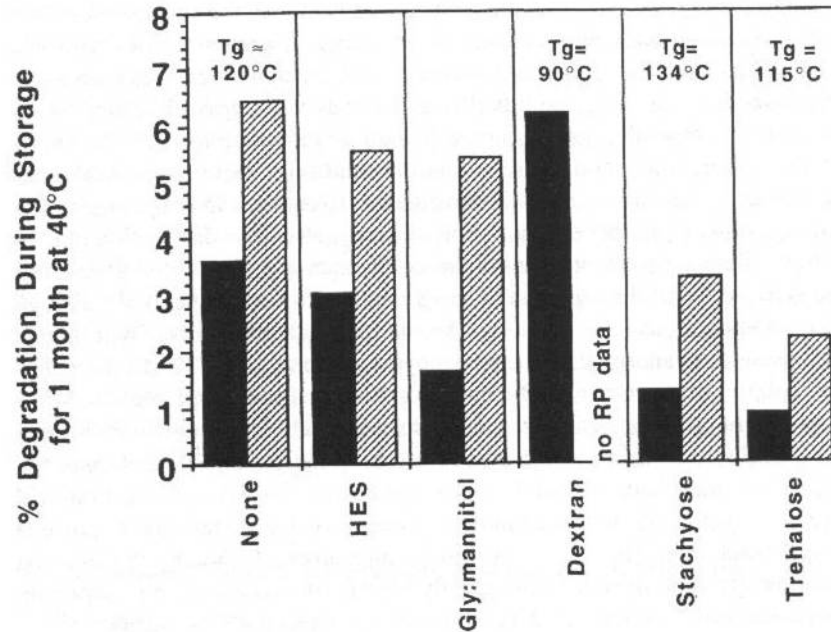
(b)



TM-1000_0219 2008-06-17 15:36 L 100 μm

Figure 21. SEM photographs of freeze-dried *Lb. coryniformis* Si3 in (a) 0.2% peptone water at 8000x magnification and (b) sucrose at 1000x magnification. The freeze-dried *Lb. coryniformis* Si3 cells in (a) have a size of approximately $2 \times 0.5 \mu\text{m}$. The image in (b) shows the amorphous structure after freeze-drying in a well-preserved piece.

Efecto de excipientes



Hormona de crec. Humano (hGH); 1 mes a 40°C.

hGH/Gly/Man 1:1:1; hGh/Dextrano 40 1:6

Buffer fosfato (Na) pH 7,4; 15% de hGH

Cont inicial de agua 1%

Reacción: oxidación de metionina y deamidación de aspargina