

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE DOS PROTEÍNAS MODELO LIOFILIZADAS, CON EL EMPLEO DE LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

A. Gutiérrez García y T. Moreira Hernández.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 27 de julio de 1996.

RESUMEN. Se conoce que la liofilización representa una vía para estabilizar proteínas, sin embargo, a pesar de los bajos contenidos de humedad, estos productos pueden presentar durante su almacenamiento, reacciones de degradación como la agregación molecular y en presencia de azúcares, reacciones de condensación bimolecular como las del tipo Maillard. Tanto en alimentos deshidratados como en otros productos ricos en carbohidratos, la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) se ha empleado para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g), por encima de la cual el producto pierde rigidez, alcanzando un estado "gomoso" en el que se suelen acelerar las reacciones de degradación por seguir una cinética del tipo WLF (Williams-Landel-Ferry) en lugar de la de Arrhenius. En este trabajo, a partir de proteínas modelo (albúmina y gammaglobulina) liofilizadas solas y en presencia de glucosa, se estudió el efecto de la temperatura de almacenamiento tanto sobre la agregación molecular, como sobre la aparición de compuestos pardos. Se analizan los resultados teniendo en cuenta la T_g determinada por CDB y se compara la predicción de la estabilidad, atendiendo a la ecuación de WLF, así como a la de Arrhenius.

ABSTRACT. Freeze-drying has usually been employed as preservation method for proteins. However, in spite of the low moisture content, some degradation reactions as molecular aggregation may take place during storage. If sugars are present, non enzymatic browning reactions have also been observed. Differential Scanning Calorimetry (DSC) has been used for measuring glass transition temperature (T_g). Above this temperature, the product loses its rigidity and the vitreous condition turns sticky. Then, the degradation rate is often accelerated. The kinetics of degradation for most freeze-dried products stored at temperature above T_g is higher than expected when Arrhenius plot is employed. Then, it is suggested to use Williams-Landel-Ferry (WLF) equation. In this paper two freeze-dried proteins (albumin and gammaglobulin alone or with glucose) are studied by means of DSC. The effect of storage temperature on molecular aggregation and non enzymatic browning are also studied. The results are discussed in terms of WLF and Arrhenius kinetics.

INTRODUCCION

La liofilización llena una importante necesidad en la industria médico-farmacéutica, por posibilitar el secado a bajas temperaturas de medicamentos y productos biológicos sensibles a la acción del calor.

Es común que la eliminación de agua por esta vía en los productos biológicos de origen proteico provoque la formación de una matriz amorfa. Esta matriz puede existir en estado altamente viscoso (estado vítreo) o en forma elástica similar a una goma.

La estabilidad física de los materiales amorfos puede caracterizarse en términos de temperatura de transición vítrea (T_g). Por debajo de T_g la movilidad de las moléculas del sistema es muy pequeña.¹

La medición de la T_g del producto liofilizado se puede usar para la predicción de su estabilidad durante el almacenamiento. El contenido de humedad residual del material deshidratado influye de manera inversamente proporcional en cierto grado, en la temperatura de transición. Por encima de T_g aparece un estado no estable químicamente (estado "gomoso") que provoca la disminución de la rigidez del sistema y por consiguiente, permite que se favorezcan las reacciones de degradación.

Una de las técnicas que más comúnmente se emplea en la determinación de las transiciones de fases en materiales orgánicos, inorgánicos, poliméricos y alimentarios es la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la estabilidad térmica de dos proteínas modelo liofilizadas en presencia o no de glucosa: una albúmina y una gammaglobulina, así como determinar la influencia de la composición y de la humedad residual sobre la T_g y la posible relación de esta o de otros eventos térmicos detectados en los termogramas, con la estabilidad de dichas proteínas.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Las proteínas empleadas para la liofilización provenían de la Planta de Hemoderivados de La Habana. Se emplearon soluciones de albúmina al 4 % sola (A) o glicosilada (AGli). Del mismo modo, se preparó una solución de gammaglobulina al 5% sola (IgG) o con adición de glucosa al 5% (IgG + glucosa).

Liofilización

La liofilización se realizó en frascos 8R, a razón de 2 mL por frasco. La congelación se efectuó a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h. Se empleó un equipo SERAIL (Francia), utilizando una presión de trabajo de 10 Pa. El secado primario se realizó de igual forma para todas las proteínas ($10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las platinas durante 12 h) y el secado secundario se realizó a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las platinas, variando la extensión entre 8 y 12 h con el fin de obtener dos niveles de humedad residual diferentes en cada producto.

Calorimetría Diferencial de Barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido se realizó en un calorímetro PERKIN-ELMER DSC-2. La velocidad de enfriamiento y calentamiento de las muestras fue de 10 K/min.

Determinación de humedad

La humedad residual se determinó en un equipo Mitsubishi Karl Fischer Titrator Model CA-06.

Almacenamiento

Las muestras se colocaron a diferentes temperaturas de almacenamiento (10, 20, 30, 37, 45, 50 y 60 °C), con el fin de estudiar la influencia de la temperatura de almacenamiento en su degradación.

Determinación de la agregación molecular

La agregación molecular se determinó a través de cromatografía de exclusión molecular en un sistema FPLC (LKB-Pharmacia). Se empleó una matriz de superosa 12 HR 10/30 para la albúmina y una matriz de superosa 6 HR 10/30 para la IgG. En la fase móvil se empleó amortiguador fosfato (pH 7).

Determinación del pardeamiento no enzimático

El pardeamiento no enzimático se determinó en las muestras reconstituidas por medición de la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro UNICAM 8625 UV/VIS.

RESULTADOS Y DISCUSION

Calorimetría Diferencial de Barrido

La figura 1 indica la presencia de un pico de carácter endotérmico al final del cual cambia la línea base. Este accidente térmico ya fue observado por Hatley² al estudiar la sacarosa liofilizada.

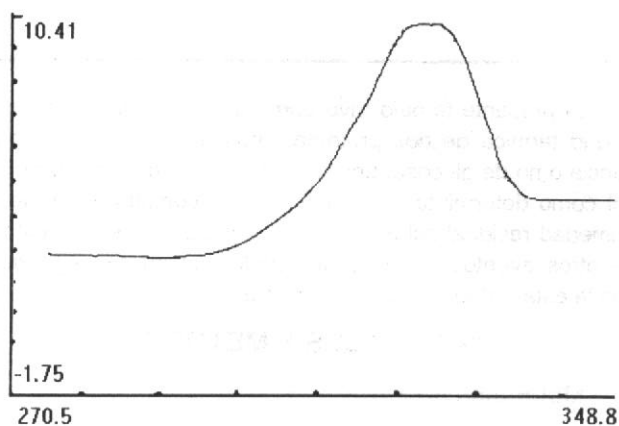


Fig. 1. Curva obtenida por Calorimetría Diferencial de Barrido para la proteína A.
(Primer barrido de calentamiento).

En un segundo calentamiento, luego de haber enfriado la muestra después de haberse producido dicho pico (Fig. 2), se observó la presencia de una transición vítrea y la desaparición por completo del pico. Este se asocia a un estrés de relajación que tiene lugar durante el primer barrido y no verdaderamente a un fenómeno endotérmico. De este modo, para precisar la Tg de estos productos es preciso realizar uno o varios barridos adicionales hasta obtener una curva "limpia" donde se observe con claridad el cambio de pendiente relativo a la transición vítrea.

Por otra parte, la Tg puede confundirse con la aparición de un fenómeno de hundimiento de estructura, el-cual mues-

tra también un cambio de pendiente, pero que desaparece con barridos sucesivos. Sin embargo, el cambio correspondiente a Tg permanece invariable siempre que el barrido se realice dentro de una gama de temperaturas que no implique cambios químicos en la muestra.

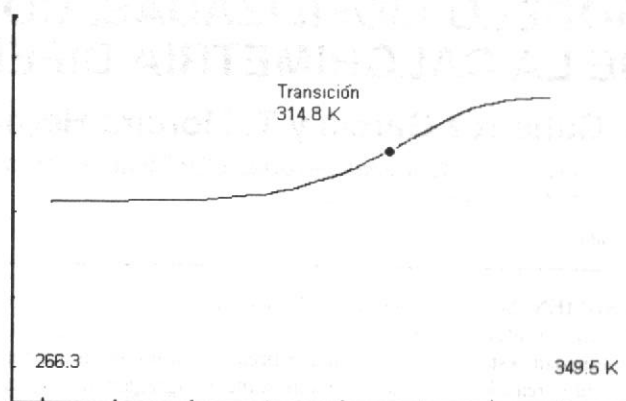


Fig. 2. Segundo barrido de calentamiento, obtenido por Calorimetría Diferencial de Barrido de la proteína A.

El valor de Tg corresponde a la temperatura máxima a la cual el producto permanece en estado vítreo. Si la temperatura excede a Tg, las reacciones de deterioro deben incrementarse de forma marcada.

En la tabla I se observa que en contraposición a lo observado en azúcares liofilizados³ en los que ligeras variaciones de humedad residual provocan grandes cambios en el valor de Tg, para estas proteínas existe sólo una ligera influencia de la humedad sobre el valor de Tg.

TABLA I
Temperaturas de transición vítrea determinadas por Calorimetría Diferencial de Barrido a las proteínas A, AGli, IgG e IgG + glucosa liofilizadas con diferentes humedades residuales

Proteína	Humedad (%)	Tg (K)
A	1,97	318
	4,78	315
AGli	0,67	312
	1,23	303
IgG	1,77	308
	2,01	303
IgG + glucosa	0,84	311

En este caso, el carácter plastificante del agua es menor debido probablemente al alto peso molecular de las proteínas y a su configuración espacial. Por su parte, la presencia de glucosa incorporada a la molécula (AGli) o en forma de simple mezcla (IgG + glucosa) tampoco aporta en estos casos el efecto plastificante que se esperaba por la presencia del azúcar en el producto liofilizado. En el caso de la IgG + glucosa, es probable que independientemente de mantenerse la misma proporción en peso (azúcar/proteína), la proporción molar sea la responsable de la pobre influencia del azúcar sobre la Tg.

Al almacenar estas proteínas, se observa que la degradación tiende a acelerarse a temperaturas superiores a

T_g, como ocurre con la albúmina liofilizada, con dos humedades residuales diferentes (Fig. 3).

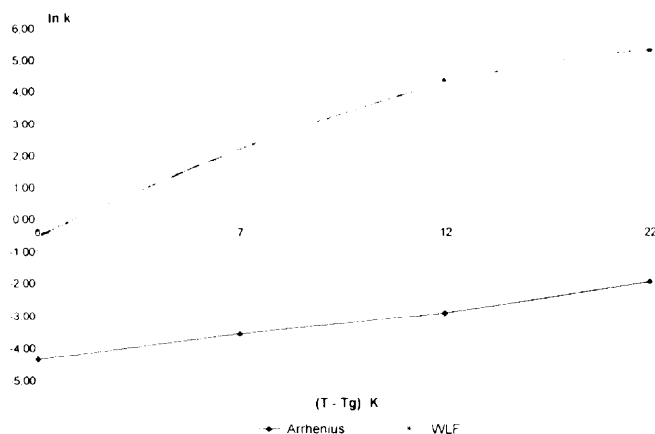


Fig. 3. Disminución del contenido de monómeros en la proteína A, liofilizada con dos humedades residuales diferentes a distintas temperaturas al cabo de 6 d de almacenamiento.

Estos resultados corroboran igualmente el efecto directo del incremento de la humedad residual sobre la degradación de esas proteínas durante su almacenamiento.⁴⁻⁷

En la figura 4 se observa la respuesta de la IgG liofilizada en presencia de glucosa, al ser sometida al análisis por CDB. Un incremento de 40 K por encima de T_g no provoca variaciones en la línea base, lo que demuestra que a pesar de que se incrementa la movilidad por estar en estado "gomoso", no surge ningún accidente térmico. Sin embargo, más allá de 355 K comienza a observarse un pico exotérmico que se desarrolla en la medida que se incrementa la temperatura. Este evento podría estar relacionado con la cristalización del azúcar, debido al incremento de la movilidad molecular. Se debe señalar que los azúcares al cristalizar, suelen liberar agua pudiendo ser esta la causa de una aparente superposición de fenómenos exotérmicos visibles a partir de 390 K. También este pico pudiera estar determinado por la formación de productos intermedios de reacciones de condensación bimolecular [pardeamiento no enzimático (Reacción de Maillard)].

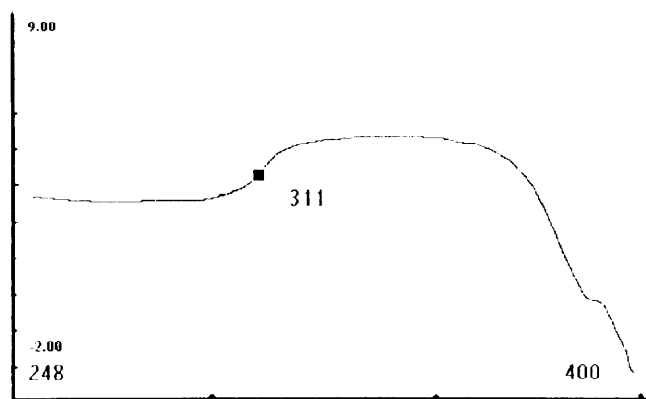


Fig. 4. Termograma obtenido por Calorimetría Diferencial de Barrido para la disolución IgG + glucosa liofilizada.

El pardeamiento no enzimático (Reacción de Maillard) es uno de los más importantes fenómenos químicos que pueden afectar la calidad de los alimentos y productos biológicos du-

rante su procesamiento y almacenamiento. Las reacciones de pardeamiento no enzimático se consideran cinéticamente como de orden cero, después de un corto periodo de inducción inicial.

En la tabla II se observa que por encima de T_g el pardeamiento no enzimático se incrementa notablemente.

TABLA II
Pardeamiento no enzimático (absorbancia a 420 nm) observado al cabo de 3 d de almacenamiento a diferentes temperaturas para la disolución IgG + glucosa liofilizada y reconstituida

Temperatura (K)	Absorbancia
278	0,101
288	0,102
298	0,104
310	0,130
318	0,181
323	0,250
333	0,524

En este caso, a temperaturas superiores a T_g, dado que la matriz liofilizada debe presentar un estado "gomoso", es de suponer que se pueda aplicar la cinética de Williams-Landel-Ferry:

$$\ln k = -C_1(T - T_g) / [C_2 + (T - T_g)]$$

Si la velocidad de pardeamiento no enzimático estuviese relacionada con la pérdida de viscosidad del sistema, las constantes de velocidad deberían incrementarse proporcionalmente al aumento de (T - T_g) siguiendo una curva de acuerdo con la expresión precedente.

En la figura 5 aparecen graficados en función de (T - T_g), tanto los valores reales de ln k como los valores teóricos correspondientes a la cinética WLF, empleando las constantes "universales" (C₁ = -17,44 y C₂ = 51,6) correspondientes a matrices poliméricas.⁸

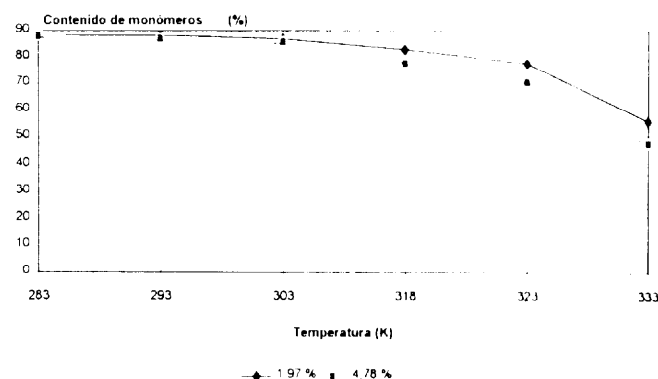


Fig. 5. Relación entre la velocidad de pardeamiento no enzimático y la diferencia entre la temperatura de almacenamiento y la de transición vítrea.

Se constata que tanto la presencia de una línea recta como los bajos valores de k indican que en lugar de la cinética de WLF, se sigue cumpliendo la de Arrhenius. Estos resultados concuerdan con los de Labuza y Baiser,⁹ Franzen¹⁰ y Roos,¹¹ obtenidos con diferentes alimentos o siste-

mas modelo susceptibles de presentar reacciones de pardeamiento no enzimático durante el almacenamiento.

CONCLUSIONES

Se observó que en proteínas como la albúmina y la gammaglobulina, el cambio de pendiente correspondiente a Tg (disminución de la viscosidad) cuando se incrementa el contenido de humedad, es mucho menos marcado de lo que se ha encontrado en azúcares. La detección de Tg (inflexión de la curva) mejora cuando está presente algún azúcar, pero no por ello, se manifiestan variaciones apreciables en el valor de Tg encontrado. Este comportamiento diferente al de los azúcares solos parece estar determinado por el alto peso molecular y la configuración espacial de las proteínas.

Cuando ellas están acompañadas de un azúcar, su fracción molar varía poco, aunque la proporción en peso del aditivo se incrementa, lo que podría explicar que Tg se mantenga casi inalterable. Estas proteínas admiten niveles de hidratación elevados, sin que por ello, la matriz liofilizada pierda rigidez. Aunque en este trabajo no se efectuaron determinaciones de viscosidad, no se apreció un hundimiento de estructura marcado después del almacenamiento a diferentes temperaturas, lo que evidencia que las variaciones de viscosidad fueron pequeñas. Estos resultados concuerdan con los de Lillie y Gosline en 1993¹² quienes encontraron que a niveles similares de hidratación la elastina no sufría cambios significativos con el incremento de la temperatura. Sin embargo, es bien conocida la aparición de este fenómeno en los azúcares liofilizados. La pobre influencia de la temperatura y la humedad sobre la viscosidad del sistema proteico, en el que las reacciones de degradación tienen lugar en un medio de alta rigidez justifica el hecho de que dichas reacciones cumplan con la cinética de Arrhenius y no con la WLF, aun-

que tengan lugar por encima de Tg, condiciones en las que el producto es más blando que en el estado normal liofilizado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felix Franks, Pafra Biopreservation, Cambridge CB4 4GG, Inglaterra, por facilitar las determinaciones de Tg por Calorimetría Diferencial de Barrido y de humedad residual en su laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Slade L. and Levine H. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, **30**, 115, 1991.
2. Hatley R.H.M. *Develop. Bio. Standard*, Vol. 74, 105-122, Karger, Basel, 1991.
3. Roos Y. and Karel M. *The glassy state in foods* Ed. J.M.V. Blanshard and P.J. Lillford, Nottingham Press, Chpt. 10, 207-222, 1993.
4. Moreira T., Cabrera L., Gutiérrez A., Cádiz A. and Catellano M.E. **Acta Pharmaceutica Nordica**, **4**, 59, 1992.
5. Moreira T., Romay Ch. y Gutiérrez A. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, **24**, 12, 1993.
6. Gutiérrez A., Moreira T., Romay Ch., Borrero H. y Castellano M.E. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **25**, 9, 1994.
7. Moreira T. y Gutiérrez A. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **25**, 13, 1994.
8. Slade L. and Levine H. **Pure and Applied Chemistry**, **60**, 1841, 1988.
9. Labuza T.P. and Baiser W.M. *Physical Chemistry of Foods*. Ed. H. Schwartzberg and R.W. Hartel, Marcel Dekker, New York, 595-649, 1992.
10. Franzen K., Singh R. and Okos M.R. **J. Food Eng.**, **11**, 225, 1992.
11. Roos Y. and Himberg M.J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **42**, 393, 1994.
12. Lillie M.A., Gosline J.M. *The glassy state in foods* Ed. M.V. Blanshard and P.J. Lillford, Nottingham University Press, Chpt. 14, 281-303, 1993.