

CARACTERÍSTICAS HIGROSCÓPICAS E ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE LA ALBUMINA E INMUNOGLOBULINA G HUMANAS LIOFILIZADAS

T. Moreira Hernández y A. Gutiérrez García.

Laboratorio de Criobiología y Liofilización, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de noviembre de 1994.

RESUMEN. Se estudió la higroscopicidad de las pastas liofilizadas de albúmina e inmunoglobulina G (IgG) humanas obtenidas industrialmente por precipitación alcohólica a partir del plasma sanguíneo. Se analizó la isoterma de adsorción correspondiente a cada producto, así como el posible ajuste de siete modelos descritos por otros autores para la adsorción de agua en alimentos. Se concluyó que los modelos de Oswin, Hasley y Khun se ajustan a toda la gama experimental para la albúmina, mientras el de Harkins-Jura cumple con este requisito en el caso de la IgG. El resto de los modelos se ajustan en ambos casos sólo a una parte de la isoterma, generalmente a la gama de a_w de menor adsorción. Al estudiar la aplicación de los modelos de BET y GAB para ambos productos, se corroboró que el primero sólo es válido para valores de $a_w \leq 0,58$, mientras que el segundo, describe toda la isoterma. El contenido de agua en la monocapa resultó muy similar para ambas proteínas.

ABSTRACT. Industrially obtained human albumin and IgG pastes, were freeze-dried. The adsorption isotherms of both freeze-dried products, were then studied. Among seven mathematical models previously studied for food water adsorption, only Oswin, Hasley and Khun models were adapted for albumin on the entire range of a_w . Harkins-Jura model was well fitted for IgG experimental points. In both cases, the rest of the models generally explain the adsorption behaviour for the low a_w range. BET model was only adapted for $a_w \leq 0,58$, while GAB model explains all the a_w range studied. The monolayer water content was similar for both freeze-dried proteins.

INTRODUCCION

La albúmina, así como las inmunoglobulinas humanas, son derivados de la sangre que se emplean directamente como medicamentos^{1,2} o como componentes de formulaciones³. La forma más común de obtención de tales productos es mediante precipitación alcohólica a partir del plasma sanguíneo⁴. Por esta vía, se suelen obtener industrialmente, pastas de albúmina e IgG con más del 95 % de pureza respectivamente, que constituyen la materia prima para otros procesos de formulación y purificación.

Una de las vías más seguras para almacenar esas materias primas es la liofilización⁵, pero esta técnica de conservación se caracteriza por impartirle al producto así tratado, una alta higroscopicidad. Las características higroscópicas de cada material, así como el envase empleado y las condiciones ambientales de humedad y temperatura, determinan la mayor o menor ganancia de agua del producto durante el almacenamiento.⁶

La adsorción de agua está relacionada con la humedad relativa que rodea a un material dado, mediante la isoterma de adsorción correspondiente, por lo que resulta de gran utilidad conocer el modelo matemático que rige este fenómeno.

La mayoría de los trabajos realizados en este sentido, sobre materiales biológicos, se han efectuado en el campo de los alimentos, habiéndose desarrollado numerosos modelos matemáticos y teorías para explicar la forma sigmoidal resultante de graficar la humedad relativa de equilibrio o actividad de agua contra el contenido de humedad del material^{7,8}. Hageman⁹ señaló que en las proteínas liofilizadas, las curvas resultantes eran del mismo tipo y que podían ser aplicadas las expresiones desarrolladas para alimentos. Del mismo modo, se conoce que los fenómenos de adsorción-desorción

en estos productos presentan histéresis, es decir, la curva obtenida durante la adsorción no resulta equivalente a la de desorción¹⁰.

Las isotermas de adsorción de proteínas se dividen en tres regiones de la curva sigmoidal: la primera corresponde a la unión del agua a sitios fuertemente activos, tales como grupos cargados o altamente polares. La segunda es una región de transición donde el agua se fija a sitios menos cargados o en la cercanía de grupos polares luego de la adsorción de una primera capa. La última región o región de multicapas, tiene lugar con condensación del agua en sitios muy débiles o con deposición de ella en capas débilmente unidas. Esta región está más relacionada con fenómenos de adsorción que con la propia adsorción física.

La teoría de Brunauer, Emert y Teller (**BET**)¹¹, derivada de la adsorción de gases y aplicada a estos productos, presupone la formación de una monocapa de agua adsorbida inicialmente (monocapa **BET**) que corresponde a la primera parte de la curva sigmoidal antes descrita.

Por su parte, la ecuación de Guggenheim-Anderson-de Boer (**GAB**), citada por varios autores y estudiada a profundidad por Weisser¹² se ha aplicado con eficacia para representar las isotermas de diferentes productos.

El presente trabajo se propuso estudiar las características higroscópicas, así como los modelos matemáticos que mejor se ajustan a las isotermas de adsorción correspondientes a las pastas liofilizadas de albúmina e IgG humanas.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de las pastas

Se trata de pastas de albúmina e IgG obtenidas industrialmente en la Planta de Hemoderivados de La Habana, me-

diente ajuste de pH y precipitación alcohólica seriada, con diversos pasos de recuperación por centrifugación a bajas temperaturas. En cada caso, se emplearon pastas correspondientes a tres lotes industriales los cuales se conservaron a -25 °C.

Extracción del alcohol remanente

La extracción de la mayor parte del etanol retenido en las pastas, se realizó por evaporación al vacío. Para ello, se mantuvieron a -20 °C en la cabina de un liofilizador y mediante cinco pasos alternos de condensación-extracción, se logró educir el contenido alcohólico a menos del 2%. Cada paso de condensación se realizó bajo una presión de 10hPa y durante 15 min, encontrándose la trampa fría a -60 °C. Cada paso de evacuación del alcohol de la trampa se efectuó durante 10min, luego de romper el vacío.

Liofilización

Una vez que el alcohol fue extraído, las pastas se congelaron (-40 °C) y se liofilizaron en bandejas de acero inoxidable (30X 30X 3) con un área de 1k gp o bandeja por lote.

Se empleó un liofilizador SERAIL (Francia). El secado primario se llevó a efecto por espacio de 10h, manteniendo las platinas a 10 °C (platinas) y el secundario, durante 6h a 20 °C. La trampa fría se mantuvo a -60 °C y la presión a 10Pa.

Humedad residual

La humedad residual se determinó por el método de Karl Fischer, utilizando un equipo Baird & Tatlock (Inglaterra).

Medición de la higroscopicidad y determinación de la isoterma de adsorción

De cada lote se tomaron 0,5 g de muestra y se pusieron en contacto con la humedad relativa creada sobre la superficie de diferentes soluciones salinas saturadas contenidas en desecadoras selladas herméticamente. Mediante pesadas periódicas se determinó el momento en que el producto llegó al equilibrio, cuando no hubo más ganancia en peso. Las experiencias se efectuaron a 25 °C, de modo que las soluciones saturadas de LiCl, MgCl₂, K₂CO₃, NaBr, NaCl, (NH₄)₂SO₄, K₂NO₃, y K₂SO₄ empleadas, provocaron respectivamente humedades relativas de equilibrio (HRE) de 11, 33, 43, 58, 75,8, 91, 92 y 96%.

Las isotermas de adsorción se construyeron graficando el promedio de la cantidad de agua adsorbida por cada lote, contra la humedad relativa en el momento del equilibrio. Para representar los valores de humedad relativa de equilibrio se utilizó el término más generalizado de actividad de agua (a_w).

$$a_w = HRE/100$$

La ganancia en peso en el tiempo, frente a una a_w dada, se consideró como un criterio de higroscopicidad.

Se estudió el ajuste de los datos experimentales a un grupo de expresiones que pueden representarse de forma lineal. Entre ellas, figuran las citadas por Pixton y Howe⁸:

Harkins - Jura:

$$1/(X_w)^2 = f(-\log a_w)$$

Smith:

$$X_w = f[-\ln(1 - a_w)]$$

Halsey:

$$\ln X_w = f[\ln(-\ln a_w)]$$

Henderson:

$$\ln X_w = f[\ln[-\ln(1 - a_w)]]$$

Chung - Pfof:

$$X_w = f[-\ln(-\ln a_w)]$$

Así como las expresiones empleadas por Labuza:¹⁰

Oswin:

$$\ln X_w = f[\ln[a_w/(1 - a_w)]]$$

Kuhn:

$$X_w = f[1/\ln(1/a_w)]$$

Al mismo tiempo, se evaluó el ajuste a las expresiones de BET:

$$a_w/(1 - a_w) W = 1/W_0 C + [(C - 1)/W_0] a_w$$

y de GAB:

$$a_w/W = [(1 - Ka_w)(1 - Ka_w + Ca_w)]/CKW_0$$

o $a_w/W = C_1 + C_2 a_w + C_3 (a_w)^2$

donde:

$$C_1 = 1/CKW_0 \quad C_2 = (1/W_0)(1 - 2/C)$$

$$C_3 = (K/W_0)(1/C - 1)$$

a_w actividad de agua del material

W contenido de agua del material

W_0 valor de la monocapa de agua

(gramos de agua/gramos de materia seca)

K y C constantes.

El desarrollo de la isoterma BET se efectuó mediante regresión lineal mientras que la GAB requirió la aplicación de una regresión cuadrática.

Para analizar la bondad del ajuste de las expresiones a los datos experimentales, se determinó el coeficiente de correlación, así como el error residual en cada caso.

RESULTADOS Y DISCUSION

Características de las pastas liofilizadas

Ambas pastas liofilizadas presentaron las características que a continuación se describen.

TABLA I
Características de las pastas liofilizadas

Pasta	Humedad	Pureza	Contenido
			de monómeros
			(%)
IgG	9,0 ± 2,1	95 ± 2	86 ± 3
Albumina	7,2 ± 1,1	97 ± 2	88 ± 2

Valores promedios para cada tres lotes experimentales de cada producto y expresados como $\bar{X} \pm DE$.

Higroscopicidad

Se pudo observar (Figuras 1 y 2) que para el valor más bajo de a_w ocurre desorción en ambas proteínas liofilizadas por presentar las muestras humedades residuales superiores a la correspondiente al equilibrio para $a_w = 0,11$. Para el resto de los valores de a_w el equilibrio hídrico después de la adsorción, se alcanzó en alrededor de 10d.

Hasta un valor de $a_w = 0,92$ los contenidos de agua alcanzados por ambos productos al llegar al equilibrio, resultaron del mismo orden. En el caso de la alta a_w estudiada (0,96), la adsorción de la IgG en 5d fue superior al máximo adsorbido por la albumina a los 20d.

Esta adsorción se incrementa notablemente con el tiempo de exposición, alcanzando con el equilibrio, un valor de humedad que duplica al adsorbido por la albumina.

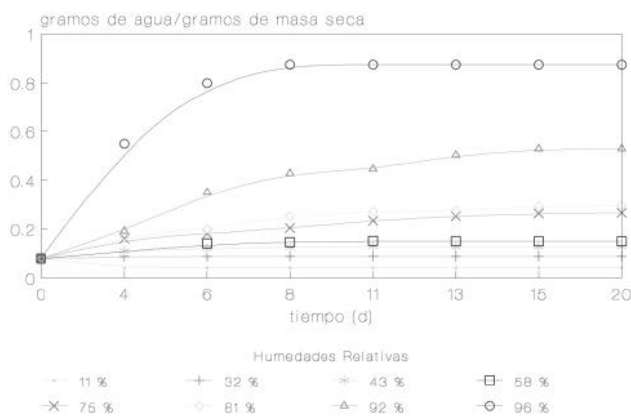


Fig. 1. Curvas de higroscopicidad de la pasta de albúmina humana liofilizada (25 °C).

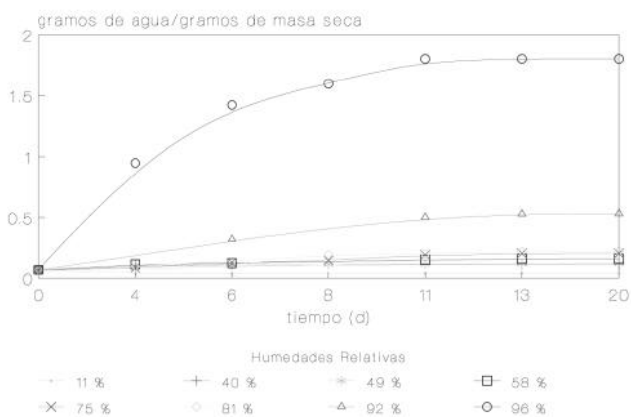


Fig. 2. Curvas de higroscopicidad de la pasta de IgG humana liofilizada (25 °C).

Los valores correspondientes al equilibrio constituyen los puntos de las isothermas de adsorción.

Isotermas de adsorción

Las isothermas de adsorción siguieron la forma tradicional de las correspondientes a los productos de origen proteico (Fig. 3). Se observó que para valores altos de a_w , el IgG se equilibra con una mayor cantidad de agua, mientras que para valores bajos la adsorción de agua se asemeja.

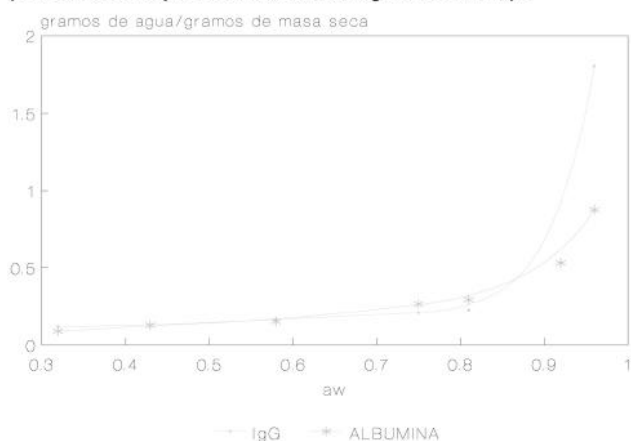


Fig. 3. Isothermas de adsorción de las pastas de albúmina e IgG liofilizadas.

En la Tabla II se muestra el ajuste de diferentes ecuaciones a las isothermas correspondientes a ambos productos liofilizados en la gama de adsorción ($a_w > 0,11$). En ella

aparecen los coeficientes de regresión así como el rango de a_w para el cual es válido el ajuste.

TABLA II
Coeficientes de correlación correspondientes al ajuste de diferentes isothermas de adsorción para la albúmina e IgG liofilizadas

Isoterma	Albúmina	IgG
Harkins-Jura	0,996 ⁴	0,995 ¹
Oswin	0,999 ¹	0,999 ³
Smith	0,996 ²	0,999 ³
Halsey	0,999 ¹	0,999 ³
Henderson	0,999 ³	0,999 ³
Kuhn	0,997 ¹	0,998 ²
Chung-Pfost	0,997 ³	0,999 ³

¹Considerando toda la gama de a_w .

²Para $a_w \leq 0,92$.

³Para $a_w \leq 0,81$.

⁴Para $a_w \leq 0,43$.

Para la albúmina, los modelos de Oswin, Halsey y Kuhn se ajustan a todos los puntos experimentales (Tabla II), por lo que pueden ser utilizados para representar la isoterma de este producto. El modelo de Smith se ajusta para $a_w \leq 0,92$, existiendo una desviación apreciable para $a_w = 0,96$. Los modelos de Chung-Pfost y de Henderson, sólo presentaron buen ajuste para $a_w \leq 0,81$. Contrariamente a estos modelos en los que las expresiones se ajustan a la parte de la isoterma de menor curvatura, el modelo de Harkins-Jura manifestó buen ajuste para los puntos correspondientes a la gama de valores altos de a_w . Este hecho coincide con los resultados de Labuza¹⁰ relacionados con la adsorción de algunos alimentos. Sin embargo, en el caso de la IgG , sólo este modelo se ajustó a toda la gama experimental, demostrando su utilidad en isothermas de este tipo, con mayor curvatura. El modelod eK huns ea justóp araa $w \leq 0,92$, mientras que el restol oh izop araa $w \leq 0,81$.

Por su parte, la aplicación de la isoterma **BET** para ambos productos debe realizarse con precaución.

Se comprobó que la isoterma **GAB** representa mejor toda la gama de a_w (Figuras 4 y 5). La isoterma **BET**, a li cual que algunas de las precedentes, presenta buen ajuste para valores bajos de a_w , donde la curvatura de la isoterma es mucho menor. En este sentido, los resultados concuerdan con los de Van den Berg⁶ al estudiar las isothermas de adsorción del almidón, en los que sólo la gama de valores bajos de a_w se ajustó a una línea recta.

Los modelos de **BET** y **GAB**, frente a los precedentes, tienen la ventaja, de que a través de ellos, se puede obtener una información más precisa de los fenómenos que tienen lugar durante la adsorción, como es el caso del cálculo de la monocapa de agua adsorbida en la primera fase del proceso, que se considera como índice de estabilidad de productos deshidratados.⁹

Se observó que, para la isoterma **BET** (Tabla III), a medida que se incluye en los cálculos los datos correspondientes a los altos valores de a_w , el valor calculado de la monocapa, disminuye con relación al que se obtiene por medio de la isoterma **GAB**. Estos resultados sólo se asemejan, cuando en los cálculos para la isoterma **BET**, se emplean los datos correspondientes a $a_w \leq 0,58$.

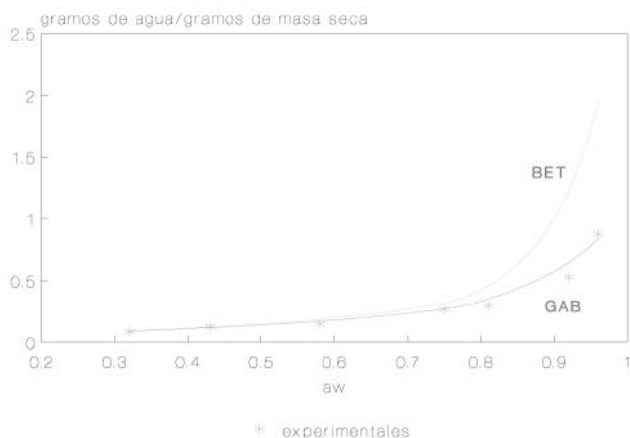


Fig. 4. Ajuste de las ecuaciones de BET y de GAB a la isoterma de adsorción de la pasta de albúmina humana liofilizada.

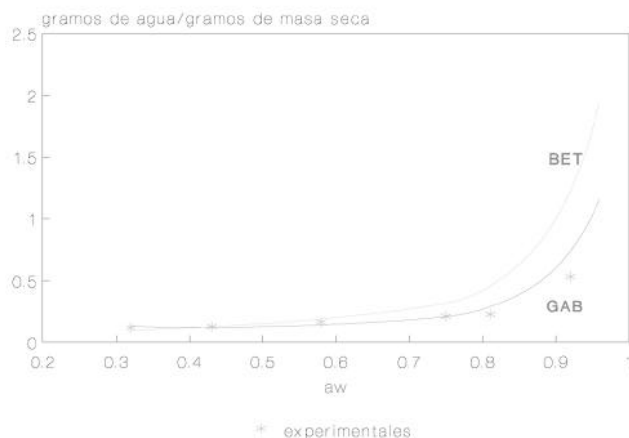


Fig. 5. Ajuste de las ecuaciones de BET y de GAB a la isoterma de adsorción de la pasta de IgG liofilizada.

TABLA III
Comparación de los valores de las monocapas de agua y de las constantes de adsorción correspondientes al aa lbúminayal al gG liofilizadas, o btenidasat ravésd el as isotermasB ETyG AB

Isoterma	Albúmina				IgG					
	W _o	CK	r	ER	W _o	CK	r	ER		
GAB ¹	0,076	1,08	10,96	0,997	0,268	0,075	1,08	11,36	0,992	0,490
		12,65	0,94				13,16	0,93		
BET ¹	0,044	-6,86		0,979	3,701	0,052	-16,50		0,976	3,490
BET ²	0,052	-14,11		0,986	2,492	0,046	-8,02		0,995	1,622
BET ³	0,069	13,03		0,998	0,641	0,058	-38,30		0,996	1,061
BET ⁴	0,071	11,29		0,997	0,740	0,078	10,59		0,999	0,142

¹ Calculada utilizando todos los puntos experimentales

² Empleando los valores de $a_w \leq 0,92$.

³ $a_w \leq 0,75$. ⁴ $a_w \leq 0,58$.

Se incluyen los estadígrafos r (coeficientes de correlación) y ER (error residual) correspondientes al ajuste de las ecuaciones para cada rango de a_w .

W_o Valor de la monocapa de agua (gramos de agua/gramos de materia seca).

C y K Constantes de adsorción.

El ajuste de los puntos experimentales a la expresión lineal de **BET** también se afecta en el mismo sentido (los valores de r se reducen, mientras el error residual se incrementa). Esto confirma el limitado valor de la isoterma **BET**, contra la gran utilidad de la isoterma **GAB**.

Resulta interesante notar que el contenido de agua de la monocapa resultó muy similar para ambas proteínas y que los valores correspondientes se encuentran en el rango de los obtenidos por Hageman⁹ y por Hsuyc ol.¹³ para otras proteínas.

CONCLUSIONES

Las isotermas de adsorción correspondientes a las pastas de albúmina e IgG liofilizadas presentan la forma sigmoidal característica de algunos alimentos.

Para la gama de valores de a_w inferiores a 0,92 el nivel de adsorción de agua resulta muy similar en ambas proteínas. Sin embargo, para 0,96 la IgG llega a adsorber el doble de agua que la albúmina.

Se comprobó que las ecuaciones de Oswin, Hlsey y Khun pueden ser empleadas para representar matemáticamente el comportamiento de la isoterma de adsorción de la albúmina en toda la gama experimental, mientras la de Harkins-Jura, se ajusta a los valores de la IgG. El resto de las ex-

presiones, explican en uno y otro caso, sólo una parte de la isoterma, generalmente la de menor curvatura (cuando la adsorción es moderada ante una a_w dada).

La isoterma **BET** permitió efectuar la determinación del contenido de agua de la monocapa, cuando se emplean valores inferiores de a_w inferiores a 0,58 corroborando que la misma no representado el rango de a_w para estos productos.

Sin embargo, la isoterma de **GAB** se ajusta en todo el rango experimental y permite además, determinar el valor de la monocapa adsorbida en la primera fase de la isoterma. Los valores resultaron ser de 0,076 g de agua/gramos de materia seca para la albúmina y de 0,075 para la IgG, que concuerdan con los reportados para otras proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. Canadian Paediatric Society Statement ID92-01. C.M.J.D. 146, 121, 1992.
2. Hansen J.F. and Ezban M. Joint WHO/IABS Symposium on the standardization of Albumin, Plasma Substitutes and Plasmapheresis, Geneva. 1980. Develop. Biol. Standard, 105-112. S. (Karger Basel), 1981.
3. Hora M.S., Rana R.K., Wilcox C.L. Int. Symp. on Biol. Prod. Freeze-Drying and Formulation, 1990. Develop. Biol. Standard. Vol. 74, 295-306 (Karger Basel), 1991.

4. Cohn E.J., Strong L.E., Hughes W.L., Mulford D.I., Ashworth J.N., Melin M. and Taylor H.L. **J. Am. Chem. Soc.** **68**, 459, 1946.
 5. Kontny M.J. **Drug Development and Industrial Pharmacy** **14**, 1991, 1988.
 6. Van den Berg C. In Properties of Water in Foods, D. Simatos and J. Multon (Ed.) M. Nijhoff Pub., the Netherlands, 119-131, 1985.
 7. Ferro Fontán C., Chirife J., Sancho E. and Iglesias H.A. **J. Food Sci.**, **47**, 1590, 1982.
 8. Pixton S.W., Howe R.W. **J. Stored Prod. Res.**, **19**, 1, 1983.
 9. Hageman M.J. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, **14**, 2047, 1988.
 10. Labuza T.P. In Theory, Determination and Control of Physical Properties of Food Materials. Cho Kyun Rha (Ed.), D. Reidel Pub. Co, Dordrecht-Holland, 197-219, 1975.
 11. Brunauer S., Emmett P.H., Teller E. **J. Am. Chem. Soc.**, **60**, 309, 1938.
 12. Weisser H. In Properties of Water in Foods. D. Simatos and J. Multon (Ed.), M. Nijhoff Pub., the Netherlands, 95-118, 1985.
 13. Hsu C.C., Ward Carole A., Pearlman R., Nguyen H.M., Yeung D.A. and Curley Janet G. Int. Symp. on Biol. Prod. Freeze-Drying and Formulation, 1990. Develop. Biol. Standard. Vol. 74, 225-271, (Karger Basel), 1991.
-