

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

SECADO POR SUBLIMACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERO QUIMICO

PRESENTA EL PASANTE

EDUARDO BESTANDIG DRUCKER

MEXICO, D. F.

1954



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dedico este trabajo con todo cariño y respeto
a mis queridos padres, como reconocimiento a
sus innumerables sacrificios.**

A mi hermana Ruth.

**A todos mis maestros,
compañeros y
amigos.**

9

Para los maestros don José Ignacio Bolívar, don
Alberto Urbina y don Benito Bucay, gracias
a cuya ayuda y consejos se pudo llevar a
cabo este trabajo.

Hago patente mi profundo agradecimiento a los Laboratorios Dr. apata, S. A., en cuyo Departamento de Liofilización se llevó a cabo este trabajo y al Químico José Ignacio Bolívar quien con sus consejos y su experiencia me guió y me ayudó hasta el final de esta tesis.

INTRODUCCION.

Las moléculas protéicas son la base de toda materia viviente. Afuera de los organismos, o sea cuando se ha extraído de un medio que no es el suyo, estas moléculas protéicas tienden a agruparse convirtiéndose en insolubles y a este proceso se llamó desnaturalización, la cual se caracteriza por una disminución en la solubilidad. La desnaturalización está influenciada sobre todo por el tiempo y por la temperatura. Siempre que algún factor aumente la agrupación de moléculas se logrará con ello también apurar la desnaturalización; mientras que si se logra bajar la temperatura del medio ambiente, mayor será el tiempo que se conserve la proteína. A medida que se baje la temperatura se logrará una mejoría natable en la conservación y debajo del eutéctico dicha conservación será mejor todavía.

El almacenamiento de productos a bajas temperaturas se usa en la actualidad ampliamente sobre todo en la conservación de alimentos y productos biológicos. Es sin embargo costoso y no siempre práctico. Por ello se prefiere emplear en la actualidad un método secado por sublimación, ya que así seca la proteína si se conserva.

La eliminación de agua de una solución protéica requiere el uso de energía pero, según acabamos de ver, el calor es una de las formas con la cual más fácilmente se perjudican. Entonces, el problema de secado se reduce al suministro de

calor con la mínima cantidad destrucción. Con proteínas que ~~se van a usar como alimentos~~, una desnaturalización pequeña es permitida; pero no se puede decir lo mismo de los productos biológicos. Por ello, en el campo médico se suele usar el secado al alto vacío como el mejor método para conservar la mayor parte de las sustancias terapéuticas.

Pero no es el secado por sublimación el único método que se puede emplear para secar materiales sensibles al calor, sino que hay muchos otros, pero en todos ellos se trata de evitar hasta donde sea posible, la desnaturalización.

Entre estos métodos, que solamente se van a citar, tenemos: secado por pulverización (74) (72), secado en película (70) (50), secado químico (30), destilación a bajas presiones, (30), y por último la pervaporación o sea secado en membranas de grano superficie (36) (30).

Pero de todos estos métodos, indudablemente el mejor es el secado por sublimación; sin embargo, es el más completo y el más costoso, este método será discutido y descrito en los siguientes capítulos.

HISTORIA

El proceso de secado cuando la proteína está sólida, recibe el nombre de liofilización. La liofilización consiste esencialmente en congelar el producto, el cual enseguida se va a sublimar en presencia de un alto vacío. Industrialmente se empezó a usar desde los últimos 20 años, aunque ya se conocía desde antes.

En 1813, William Hyde Wollaston describió un método parecido al que ahora se conoce, ante la Royal Society de Londres. En 1818, el profesor John Leslie hizo un aparato que fué sumamente parecido al de Wollaston. Sin embargo, a ninguno de los dos se les ocurrió usar la sublimación para el secado. Y hasta es difícil encontrar alguna relación entre sus experiencias y el desarrollo moderno de la liofilización. (16)

En 1896, Martín describió un aparato que consistía en lo siguiente: El suero por secar era filtrado en una bujía Chamberland y recibido en matraces, los cuales se ponían en un baño a 40°. Los matraces se conectaban con un frasco condensador puesto en hielo, con el cual se unía una trompa de vacío conectada a la llave de agua. El vapor de agua evaporada del suero de los matraces y arrastrado por el vacío se quedaba en el frasco condensador.

Strumia, Mac Graw y Reishel acreditaron a Bordas y Vanterbergue en 1903 los principios de la liofilización aunque su proceso parece más bien una destilación al vacío (16) (30).

Pero el que verdaderamente impulsó la liofilización fué Shakell en 1909, el cual la aplicó a los productos biológicos.

En su aparato la proteína es congelada con una mezcla de sal y hielo. Después introdujo la proteína en un aparato conectado por un tubo a una bomba de vacío y conectado a un tubo con un deshidratante como ácido sulfúrico, la evaporación fué tan rápida que el material permanece congelado y se efectuó un secado por sublimación sin que haya habido una fase líquida intermedia. El producto liofilizado y obtenido de tal manera difiere del que se obtendría si se secara a partir del estado líquido en que presenta una mayor solubilidad y en que el volumen que se ocupa es casi igual que el original. (16)

W. J. Elser llevó a cabo un trabajo muy amplio con diferentes productos biológicos. Este trabajo fué publicado por Elser, Thomas y Stephen en 1935. Ellos usaron como disecante pantóxido de fósforo; pero pronto vieron que era demasiado costoso, sobre todo cuando se trabaja en pequeñas cantidades. De esta manera ellos introdujeron un condensador que se refrigeraba mecánicamente. (9) Lo primero que hicieron fué congelar el producto en una ampollita de forma que el espesor de la proteína fuera mínimo. Además, todo el sistema se conectaba al vacío. Cuando el vacío había subido suficientemente, entonces la liofilización había terminado.

Pero más interés presenta sobre todo, desde el punto de vista comercial, los trabajos de Flosdorf y Mudd, también en 1935. Ellos usaron la misma técnica que en el caso anterior, solamente que sustituyeron el condensador por una trampa de vapor sumergida en un baño de metil celosolve y hielo seco. Con esto obtuvieron: una temperatura de -78° .

Otros que contribuyeron mucho en el avance de la liofilización fueron Reichel, Masucci, Mac Appine y Boyer. El aparato descrito por ellos era muy semejante al de Flosdorf.

En 1933, Flosdorf en la Universidad de Pennsylvania (laboratorio de la escuela de Medicina), sacó los primeros productos que fueron usados como medicamentos.

La casa Sharp & Dohme, muy rápidamente reconoció las ventajas que se podrían sacar de la liofilización. Ellos ins-

talara la primera unidad industrial en 1935. (17) Gracias a su experiencia y a su esfuerzo, se pudo almacenar plasma humano para 1941, cuando entraron los Estados Unidos a la segunda guerra mundial.

En 1940, Flosdorf y Mudd describieron un nuevo método, el proceso Desivac. Puesto que un gramo de agua va a producir 1000lt de vapor aproximadamente cuando la presión de vapor es 0. Imm. de mercurio, se puede evitar el condensador si se tiene una bomba lo suficientemente grande que puede mantener el alto vacío a pesar de la producción continua de agua. Ellos resolvieron este problema por medio de una bomba de la casa Stokes, especialmente construída.

En 1943, Strumin y Mac Graw hicieron una unidad pequeña sobre todo para hospitales. Ellos hicieron una liofilizadorrefrigerado mecánicamente que era completamente automático.

Levinson y Oppenheimer usaron un sistema de refrigeración en cascada como condensador. En estas condiciones alcanzaron fácilmente la temperatura de -120° . Posteriormente vieron que era más económico trabajar -40° así que emplearon este método solamente para la congelación.

En general, en tiempos de la guerra pasada y posteriormente todo el interés se concretaba a la producción de grandes cantidades de proteína seca, dejando los métodos de laboratorio, solamente para la investigación.

El producto que se obtiene después de una liofilización ocupa prácticamente el mismo espacio que ocupaba cuando estaba líquido. El producto es poroso y tiene una estructura parecida a una esponja. Así, cuando se añade ésta fácilmente se introduce a través de los poros, lográndose con ello una rápida disolución. Por ello Reichel ha llamado suero "liofilizado" al que se ha obtenido en esas condiciones. Esta palabra es recomendable ya que sirve para señalar la característica más notable del producto así preparado, o sea su solubilidad.

PRINCIPIOS BASICOS

A).—VENTAJAS DE LA LIOFILIZACION

El secado al alto vacío es muy ventajoso por muchas razones, de las cuales las más importantes se van a resumir: (25), (15).

1).—Como ya se ha dicho la liofilización es un proceso que se efectúa a bajas temperaturas. Esto es muy conveniente para sustancias tales como plasma humano, suero, bacterias y en general sustancias biológicas y farmacéuticas; además a estas temperaturas la actividad biológica se retiene. Si el secado se ha hecho en forma correcta, hay sueros que se pueden quedar 5 años sin sufrir ninguna destrucción a temperaturas normales, mientras que si se mantienen a -5° , la actividad sigue igual, por un período de 10 años o más.

2).—Como el producto se va congelar no hay formación de espuma a menos que la congelación se haya hecho a temperaturas arriba del eutéctico. Por lo tanto conviene determinar la temperatura del eutéctico y siempre congelar abajo de éste.

3).—Debido a la baja temperatura a que se trabaja, la pérdida de componentes volátiles es muy pequeña.

4).—En la mayor parte de los casos, cuando se efectúa una liofilización, a pesar de que va ocurriendo una concentración debido a que se está sublimando el solvente, el soluto permanece homogéneamente. El residuo seco queda como una

estructura altamente poroso, ocupando prácticamente el mismo espacio que ocupa cuando estaba líquido. Esta es la principal razón por la cual se consigue, cuando se añade agua destilada, una solubilidad tan rápida y tan completa: como ejemplo de eso tenemos el plasma humano liofilizado que tiene una avidez muy grande por el agua y que por lo tanto se disuelve muy fácilmente. La gelatina es uno de los ejemplos más notables; cuando se quiere disolver se necesita agua caliente; la solución se puede liofilizar convirtiéndose en un sólido poroso que entonces es fácilmente soluble en agua fría. Sin embargo, no todas las sustancias tienen esta alta velocidad de disolución, por ejemplo, antitoxinas globulínicas.

5).—No hay coagulación, debido a que las moléculas de soluto tiene una posición fija que no llegan a perder en el transcurso de la liofilización.

6).—Bajo las condiciones tan drásticas que hay en el sistema, debido a la baja temperatura, a la cual se trabaja, es difícil que haya desarrollo de bacterias o fermentaciones enzimáticas. Es la única forma de obtener estreptomycinina sin que haya dichas fermentaciones.

7).—Debido al alto vacío que se forma, habrá poco Oxígeno presente; ni siquiera los compuestos más fácilmente oxidables pueden sufrir cambios. El contenido de ácido ascórbico del jugo de naranja secado por sublimación se ha visto que no ha disminuído a lo largo de todo el proceso. También el contenido de los lipoides a lo largo de toda la liofilización es constante.

B).—DEFINICION DE ALTO VACIO

El comportamiento de gases y vapores a presiones normales es determinado por el número de choques entre las moléculas que se encuentran en constante movimiento irregular y las paredes del recipiente que las contiene con una velocidad media que es función de la temperatura y el peso molecular. (3) (29).

Pero cuando la presión baja, el comportamiento de los gases es completamente distinto. Así el coeficiente de transmisión de calor y la viscosidad que son generalmente independientes de la presión en un alto vacío se vuelven dependientes de ésta. (39)

Por la ecuación de los gases perfectos:

$$PV = nRT \dots\dots\dots(1)$$

vemos fácilmente que disminuyendo P disminuye el número de molécula por unidad de volumen.

Por otra parte, tenemos que la trayectoria libre media viene dada:

$$l = \frac{1}{\sqrt{2} \pi n \sigma^2} \dots\dots\dots (1)$$

en la cual tenemos que l es la trayectoria libre media, en el número de moléculas por unidad de volumen y el diámetro de colisión.

Por último, tenemos que el número de choque de las moléculas por unidad de volumen y por segundo, z viene dada por la ecuación:

$$z = 2 n^2 \sigma^2 \sqrt{\frac{\pi RT}{M}} \dots\dots\dots (3)$$

De las ecuaciones (2) y (3) se deduce fácilmente que disminuyendo el número de moléculas disminuye el número de choque entre las moléculas aumentando en cambio la trayectoria media.

Vamos a calcular como ejemplo los valores de z y l para el caso del aire que se está desalojando del aparato. Supongamos que la presión final es de 100 micras y la temperatura media de 0° o sea 273° R.

De la ecuación (1) tenemos:

$$n = \frac{0.1 \times 1000 \times 6.06 \times 10^{23}}{10^6 \times 760 \times 0.082 \times 273} = 3.54 \times 10^{15}$$

De la misma manera substituyendo en las ecuaciones (2) y (3), nos queda:

$$l = \frac{1}{\sqrt{2} \pi \times 3.54 \times 10^{15} \times (3.45 \times 10^{-8})^2} = 0.0158 \text{ cm.}$$

$$z = 2 \times (3.54 \times 10^{15})^2 \times (3.45 \times 10^{-8})^2$$

$$\sqrt{\frac{314 \times 273 \times 832 \times 10^{-7}}{29}} = 1.42 \times 10^{11}$$

Comparando estos resultados con los que se obtendrían por ejemplo con Hidrógeno a presión normal y a una temperatura de 0° , se ve la razón por la cual, el comportamiento de los gases y de los vapores es tan distinta en el vacío que a presiones normales. Para ver clara la diferencia entre uno y otro caso vamos a poner a continuación los valores l y z para el Hidrógeno.

$$l = 1.67 \times 10^{-5} \text{ cm.}$$

$$z = 13.7 \times 10^{26} \text{ choques por segundo.}$$

Podemos considerar que nos encontramos en presencia de un alto vacío cuando la trayectoria libre media es igual a las dimensiones del aparato. (39)

C).—SUBLIMACION Y FACTORES QUE LA REGULAN
(50) Y (49)

La sublimación cubre los cambios físicos que se efectúan cuando una substancia pasa del estado sólido al gaseoso y después vuelve otra vez al estado sólido. Se caracteriza por la ausencia de toda fase líquida. La temperatura a la cual la presión de vapor del sólido es igual a la presión de vapor de la fase gaseosa que está en contacto con dicho sólido se llama punto de sublimación. La palabra sublimación se usa también en el caso en que solamente se toma en cuenta la vaporización del sólido. La velocidad de sublimación depende de una serie de factores, teniendo cada uno de ellos la importancia según el caso de que se trata. Estos factores son los siguientes:

a).—Flujo de calor al sólido.

Este factor es de los más importantes sobre todo para materiales sensibles al calor, tales como con los que se trabajó en esta tesis. Generalmente el sólido se encuentra en frascos o charolas, así que la transmisión de calor se va a hacer a través de ellos.

En una liofilización se hace circular generalmente agua o algún otro fluido que va a calentar los frascos o charolas en los cuales se encuentra la proteína. Este calentamiento se hace por conducción a través de los recipientes, los cuales a su vez van a conducir el calor hasta el hielo sólido. De allí el calor se transmite hasta la superficie de hielo en donde se está efectuando la sublimación. Si observamos los gradientes de temperatura, se puede poner la siguiente ecuación de transmisión de calor en función de las resistencias: (75)

$$\frac{q}{A} = \frac{t_1 - t_2}{\frac{1}{h_L} + \frac{B}{k_m} + R_t + \frac{x}{k_s}}$$

en la cual t_1 es la temperatura del medio caliente, t_2 la temperatura de la superficie de sublimación, h_L coeficiente de transmisión del calor del medio caliente, B espesor del reci-

piente que contiene la proteína, k_r conductibilidad térmica de este recipiente, R_i resistencia térmica en la interfase del sólido congelado y del recipiente, x espesor de la capa de hielo, k_i conductibilidad térmica del hielo y q/A cantidad de calor que se va a transmitir.

De esta ecuación vemos que la transmisión de calor y por lo tanto la velocidad de sublimación depende de 4 resistencias de las cuales $1/h_1$ y B/t_m son pequeñas, mientras que R_i y x/k_i son las que controlan. Por lo cual podemos decir que la velocidad de transmisión de calor depende de 3 factores: 1) como se adhiere el sólido a las paredes; 2) el espesor del sólido y 3) la conductibilidad térmica del sólido. Pero probablemente el factor que más afecta la transmisión de calor sea el segundo, del cual se hablará ampliamente más adelante.

b).—Velocidad de cambio de estado de la fase sólida a la fase gaseosa a temperatura constante.

Este factor no tiene ninguna importancia.

c).—Velocidad de transporte de la zona en que se vaporizó a la zona en que se va a condensar.

Esta parte corresponde a un problema de flujo de fluidos. Hay que advertir que el mecanismo de flujo difusional a través de una atmósfera inerte es el proceso más lento de todos y por ello se debe evitar hasta donde sea posible. Para ello se va a tratar que la distancia del punto en donde se efectúa la sublimación hasta el condensador sea la menor posible. Además se va a usar una bomba de vacío.

d).—Velocidad de cambio de gas a sólido.

Este proceso tiene importancia solamente si se quiere obtener una forma determinada de cristales.

e).—Flujo de calor en el hielo formado debido a la congelación.

Esta parte es de las más importantes y una de las que más fácilmente se controlan. Generalmente en estos casos se usa un medio cualquiera que produzca una temperatura lo más bajo posible.

DESCRIPCION DE UN LIOFILIZADOR

ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA LIOFILIZACION

Un liofilizador es un aparato que consiste esencialmente en una cámara, en una bomba de vacío y en un equipo de refrigeración. La cámara tiene 6 placas, 3 en las cuales se va a poner la proteína y las otras tres, que van a hacer el papel de condensador. Además entre ambas hay una placa gruesa de metal.

Cuando se va a liofilizar una proteína se puede colocar éstas, ya sea en charolas o bien en unos frascos, los cuales a su vez se van a poner en charolas. Cada procedimiento tiene sus ventajas y sus desventajas. Cuando se seca en charolas la humedad final es menor, puesto que el vapor de agua que se desprende tiene una trayectoria mucho más fácil. Pero como después hay que pasar la proteína ya liofilizada de las charolas de los frascos entonces se puede volver a hidratar, aunque la cantidad de agua de hidratación sea pequeña. Así trabajando con precauciones como la de tener un mechero prendido y bajo una campana, se vió que la humedad de una proteína cuando trabaja en charolas y después cuando se encontraba en los frascos era respectivamente de 2.45 y de 2%. Por lo tanto no debe de tomarse demasiado en cuenta este factor.

También hay que tomar en consideración el hecho de que los frascos en su base no son paralelos a las placas sino que son curvos y por lo tanto habrá una parte del frasco que no esté en contacto directo con las placas. Por ésto en la mayor parte de los casos la liofilización se prefiere hacer en charolas.

En la primera etapa del secado se puede lograr que el suministro de calor sea constante. Para cálculcs preliminales Greaves encontró la siguiente relación: 1 watt de calor secará un ml en una hora.

El calor aplicado al material congelado produce una diferencia de presiones de vapor entre las dos superficies, en la

que se está efectuando la evaporación y en la que está efectuando la condensación. Por analogía a la ley de Ohm podemos decir:

$$\frac{\text{Diferencia de presión de vapor}}{\text{obstrucción al flujo}} = \text{gasto en volumen}$$

dado que el gasto en volumen está directamente relacionado con la cantidad de calor suministrada tenemos:

$$\frac{\text{Diferencia de presión de vapor}}{\text{obstrucción al flujo}} = K \times \text{Watt.}$$

La unidad de resistencia obstructiva es aquella resistencia que bajo una diferencia de presiones de 0.01 mm. de mercurio permite el paso del vapor con el mismo gasto con que pasaría si el calor suministrado fuera de un watt.

$$\frac{P}{R} = \frac{W}{100} \quad \text{----- (5)}$$

Vamos aplicar esta ecuación a un caso práctico. Sea la presión final de 0.12 mm. de mercurio; la temperatura de las placas 40° y supongamos que sean 9 charolas las que vamos a usar. (3) Greaves ha hecho una gráfica en la cual se relacionan temperaturas y calores. Así a 40° corresponde una cantidad de calor de 140 watt.

a).—Suero en charolas abiertas.

Despejando de la ecuación (5) R, tenemos:

$$R = \frac{.12 \times 100}{140} = 0.0864 \text{ U.O}$$

Y como tenemos 9 charolas:

$$\frac{0.0864}{9} = 0.0096 \text{ U.O / charola}$$

b).—Suero que se encuentra en botellas abiertas; sean 20 por charolas.

$$\frac{140}{9} = 15.6$$

$$R = \frac{.12 \times 100}{15.6} = 0.775 \text{ u.o. / charola}$$

De donde se vé fácilmente que es mucho mejor liofilizar en charolas abiertas que en frascos.

Ya fué dicho que las placas inferiores del liofilizador se usan como condensador del vapor de agua. Para el diseño de un condensador se debe tener en cuenta estos dos factores: a).—la temperatura a la cual va a trabajar, b).—la selección del refrigerante más correcto.

Generalmente la temperatura del condensador se mantiene entre -30 y -40° . Si observamos una gráfica de presión de vapor contra la temperatura se puede ver que como efecto condensador, las dos temperaturas son casi iguales. Sin embargo se puede decir a favor de una temperatura más baja que menos vapor de agua se va a la bomba y además se logra bajar un poco más la presión de vapor. Sin embargo, es difícil escoger a los 40° , un refrigerante que sea de veras económico. Por lo tanto, a la bomba de vacío se le equipa con un pequeño clarificador que vaya eliminando el agua y la humedad final se baja, ya sea subiendo el agua de calentamiento al final del ciclo de secado o bien haciendo un segundo secado en el cual el condensador tenga un disecante de baja presión de vapor, tal como pentóxido de fósforo, gel de sílice. Por lo tanto la temperatura recomendada está comprendida entre los -30° y los -40° aunque por ningún razón conviene que sea inferior a estas temperaturas.

En cuanto a la máquina refrigeradora, el refrigerante que se emplea es Frecn 12. Su punto de ebullición es de -217° F. la cual es suficientemente baja para la mayor parte de los casos.

La bomba de vacío es una de la casa Stokes; es del tipo de las rotativas, sumergidas y con sello de aceite. (57) El objeto de esta bomba es primero: eliminar el agua del sistema hasta que se haya obtenido la baja presión deseada y después (62) mantener esta baja presión, lo cual se logra bombeando vapores no condensables, aire que se ha fugado dentro del aparato, etc.

Para hacer el diseño de la bomba de vacío se debe de tomar en cuenta:

- a).—grado de vacío necesario.
- b).—tiempo de bombeo
- c).—naturaleza y cantidad de vapores y gases que van a ser tratados.

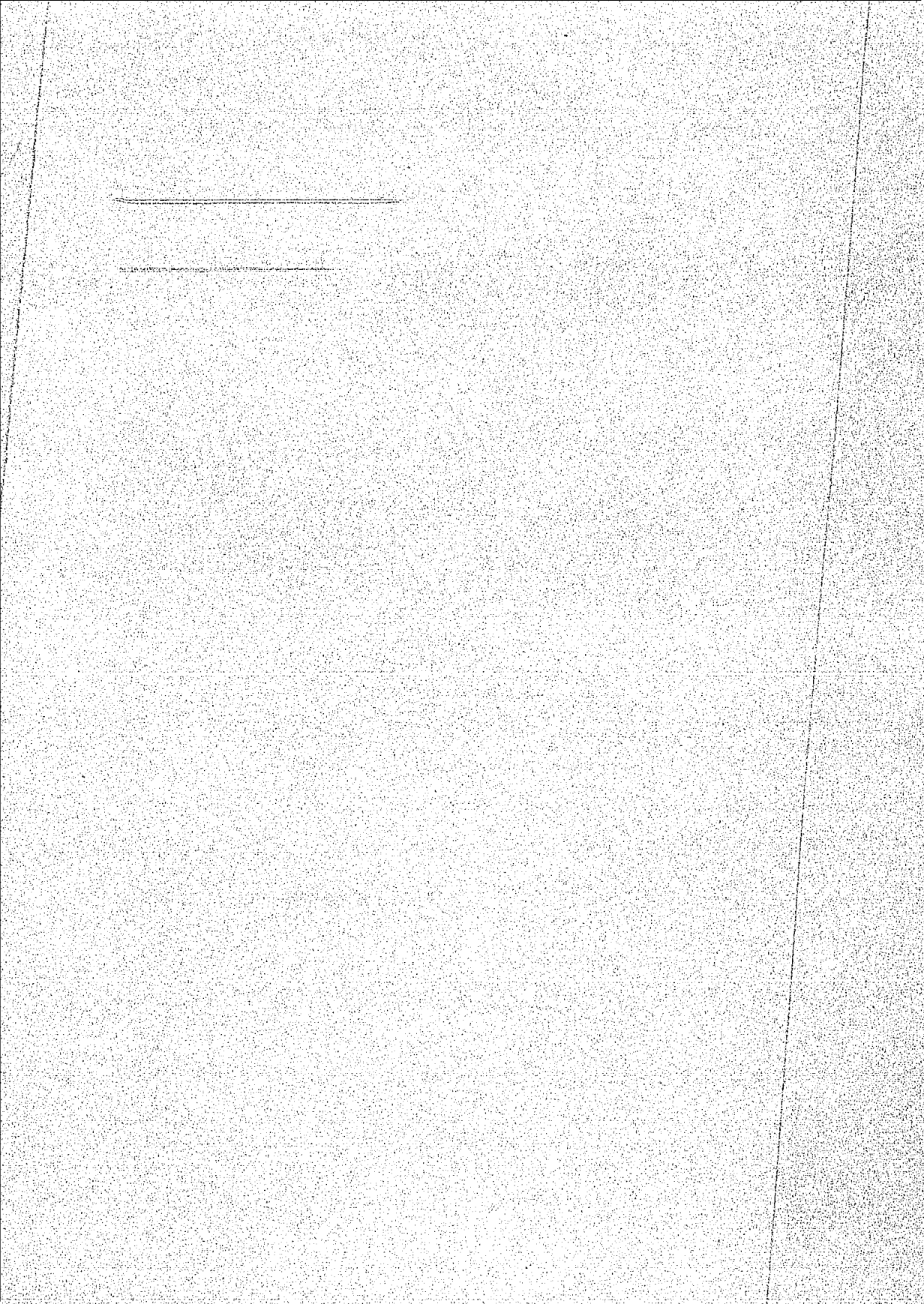
Es muy importante que todas las tuberías del vacío sean impermeables a cualquier fluido exterior. Además conviene que la cantidad de accidentes en la tubería sea lo más pequeño posible, como codos, etc. Además, conviene que sean lo más corto posible. (63)

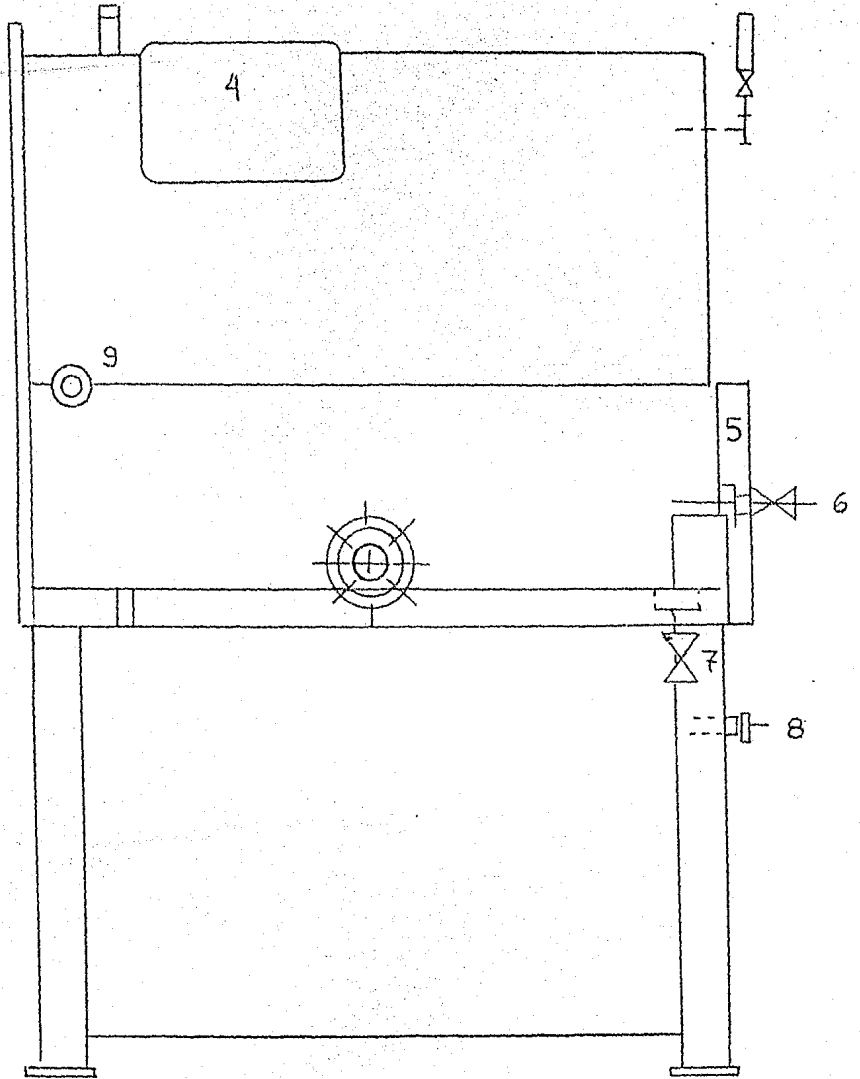
Entre el liofilizador y la bomba hoy generalmente una sección en forma de U invertida; esto tiene por objeto el hacer de trampa para evitar que los vapores pasen a la bomba. Se tratará siempre que el clarificador esté cerca de la base de la bomba y además constantemente se debe de revisar su nivel.

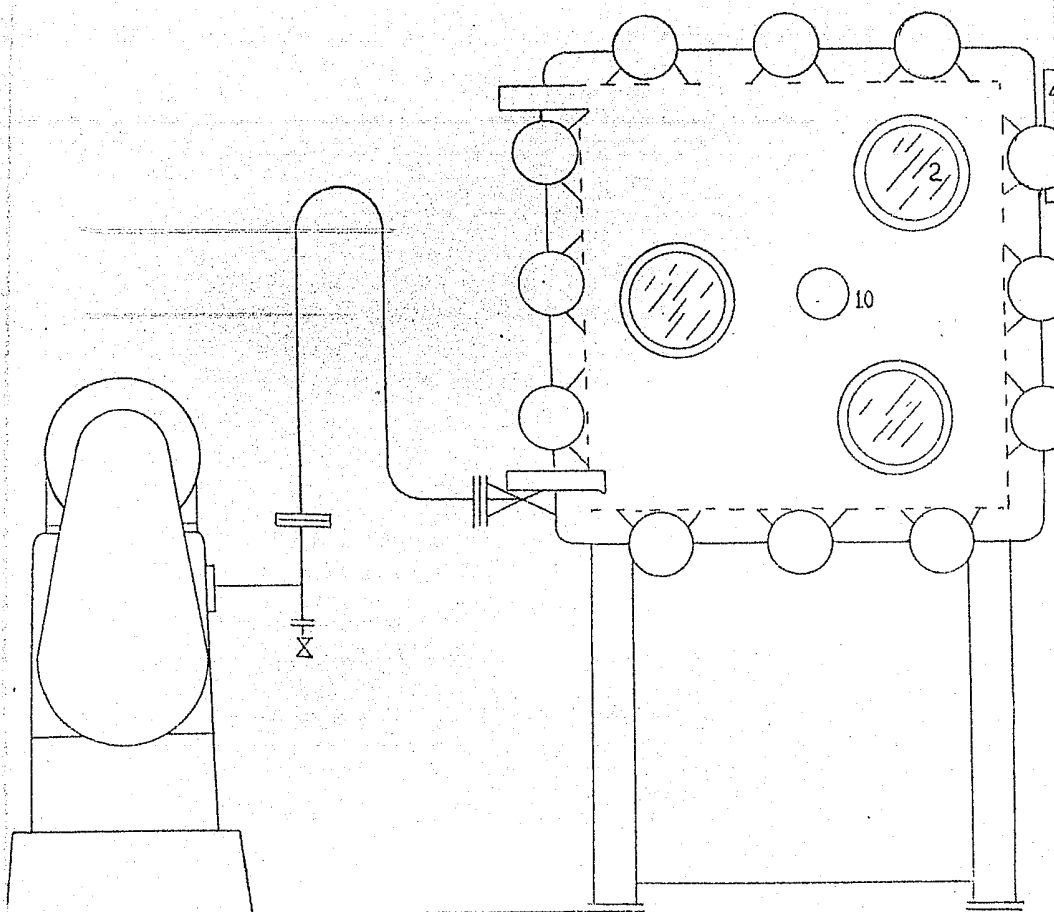
Cuando se va a efectuar una liofilización, lo primero que se debe hacer es congelar el producto. Como ya se dijo, se puede hacer la liofilización de dos maneras: ya sea que las proteínas se encuentren en frascos, o bien en charolas; tanto en un caso como en el otro, la congelación se llevó a cabo en una paleta que tiene una temperatura de -30° . La congelación consta de 3 períodos". (48)

a).—Se enfría el material de la temperatura ambiente a la temperatura de congelación. Esta fase es relativamente rápida, por la gran diferencia de temperaturas que hay entre el medio ambiente y el refrigerante.

b).—Cuando se llega al punto de congelación la temperatura permanece constante. En este período una cantidad







1

FIGURA 1.—APARATO DE LIOFILIZACION

- 1.—Bomba de vacío.
- 2.—Ventanita por la cual se puede ver el termómetro de la parte interna.
- 3.—Mariposa que ayuda en el cierre.
- 4.—Manómetro Mac Leod.
- 5.—Aislamiento.
- 6.—Válvula que permite la entrada del agua que va a fundir el hielo.
- 7.—Válvula que permite la salida del agua.
- 8.—Termómetro.
- 9.—Salida del agua de fusión cuando se desborda.
- 10.—Lugar en donde se rompe el vacío.

de calor conocida como el calor latente de fusión debe de ser aplicado.

c).—Cuando todo el producto se ha congelado, la temperatura vuelve a bajar hasta alcanzar la temperatura del refrigerante.

La cantidad de calor total es igual:

$$Q = W (C_{P1} (t_1 - t_0) + \lambda_0 + C_{P2} (t_0 - t_2))$$

en la cual t_1 , t_0 y t_2 , son las temperaturas del aire ambiente, la de congelación y la del refrigerante respectivamente. C_{P1} , y C_{P2} son los calores específicos respectivos y W es el peso de la solución que se va a congelar.

Aplicando esta ecuación a datos experimentales, tenemos:

$$Q = 2.7 \times 2.2 \left[0.9 \times (68 - 32) + 124 + 46 (82 + 2) \right] =$$
$$- 10600 \frac{\text{B.T.U.}}{\text{ciclo}}$$

Como no hay datos de C_p proteínas, éstos fueron tomados de varios alimentos y después se sacaron los promedios.

Después de haber congelado el producto, se pone en las placas superiores del liofilizador, el cual se echa a andar.

La relación que hay entre la temperatura de la superficie del condensador, el vacío necesario y otros factores dependen del coeficiente de transmisión de calor de la superficie fría. Este factor depende de 3 variables: a).—gases no condensables que estén con el vapor de agua; b).—naturaleza de la superficie condensadora, así por ejemplo: es mejor una superficie metálica que una de vidrio; c).—Área de condensación y espesor de la capa de hielo de estos tres factores el que más interesa es el primero, por lo cual se deberá evitar hasta donde sea posible la presencia de gases no condensa-

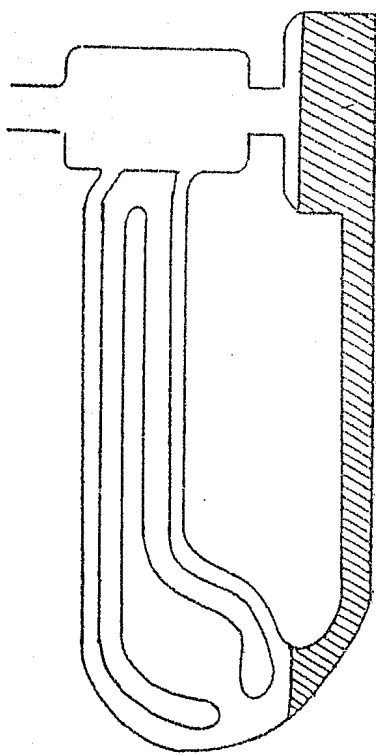
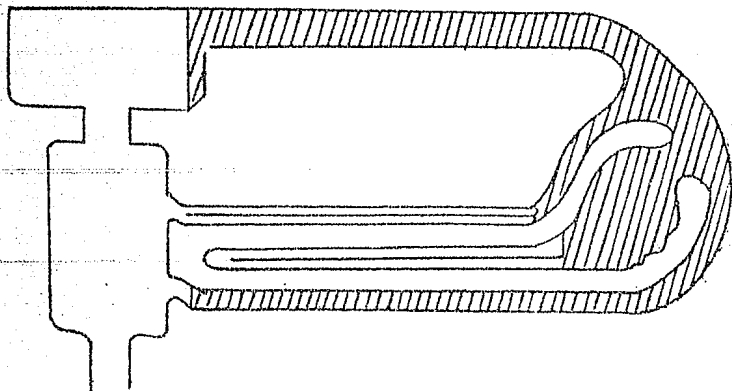


FIGURA 2.--MANOMETRO Mc LEOD.

bles. Para los otros dos factores se ha procurado evitarlo usando superficies de una área lo más grande posible. Morse (48) inclusive, ha propuesto una raspadora para que vaya eliminando el hielo a medida que se forma; con el inconveniente de que un aparato así sería sumamente difícil de construir.

La presión de vapor del producto correspondiente a la temperatura a la cual se va a secar, determina la temperatura del condensador. Por lo tanto, para cada temperatura del producto, hay una temperatura del condensador determinada, si se baja de esta temperatura, ya no se gana nada. A medida que la liofilización continúa hay un límite en el flujo del vapor, debido a que el vapor producido por las capas interiores de la proteína sólida tiene que atravesar las superiores, produciendo por lo tanto un flujo de vapor a través de orificios. De acuerdo a la ecuación de Napier (69) cuando la presión de vapor del condensador es 55% la presión de vapor de la superficie del producto se obtiene un flujo máximo.

Con el fin de poder efectuar la sublimación se necesita suministrar una cantidad de calor que viene siendo el calor de sublimación. (17) El calor latente de sublimación tiene un valor más alto que el calor latente de evaporación. Termodinámicamente el calor latente de sublimación viene siendo la energía necesaria para sublimar un gramo de agua a la temperatura ambiente, con el fin de producir vapor; o sea que es equivalente al calor latente de fusión del hielo más el calor latente de vaporización del vapor producido a esa temperatura.

Ese calor se suministra en forma de agua que se hace circular dentro de las placas. Al final del proceso se puede llegar inclusive a subir la temperatura del agua a 60° y aún a veces consideran que a 100° (17) la proteína en esas condiciones no se desnaturaliza. Estas condiciones tan drásticas no convienen y por ello la máxima temperatura que se permite es la de 40°.

Con el fin de controlar la presión y la temperatura a lo largo de todo el proceso, se utilizan unos termómetros y un manómetro.

Para la temperatura se suele emplear unos termómetros de metal que se colocan convenientemente en las charolas o bien en los frascos, generalmente uno o dos por placa, de modo que se pueda ver a través de las ventanillas del liofilizador.

Para tener un control sobre la baja presión que hay en el sistema se debe medir regularmente en todo el proceso. Para ello se emplea todavía hoy, un manómetro debido a MacLeod, (se construyó por primera vez en el año de 1874). Aunque hoy ya se han hecho varias modificaciones el principio sigue siendo el mismo. (6), (15), (52), (7), (19). Este manómetro se puede usar fácilmente desde una presión de 1-5000 micras.

En el manómetro MacLeod se da la presión de los gases no condensables únicamente, principalmente la del aire; si en el sistema hay gases no condensables aparte del aire, éstos no producen error, pero el vapor de agua o el alcohol sí lo hacen, a menos que el manómetro esté muy bien diseñado. El manómetro MacLeod consiste esencialmente en una caja que se puede girar de una posición horizontal a la vertical; cuando ya se encuentra en dicha posición, el manómetro ha tomado una cantidad de aire V a la presión P del interior del liofilizador. El aire así tomado es comprimido a la presión P siendo el nuevo volumen V . La presión P es la diferencia en nivel de mercurio en el tubo del centro y el tubo que está a la derecha. La ley de Boyle se usa para calibrar la escala. (Ver la fig 2).

Durante la compresión, la relación entre P y V se aplica solamente a gases no condensables; con vapores condensables, tales como el de agua hay condensación que hace subir al nivel del mercurio en el tubo central, dando un resultado que en realidad no existe. Con el fin de evitar ésto se necesita poner una trampa con un adsorbente conveniente para dichos vapores.

res. Este adsorbente necesita tener una presión de vapor menor que la mínima que se va a encontrar en todo el sistema.

Cuando la presión ha bajado convenientemente (100-200^o micras) entonces se puede considerar que la liofilización ha terminado; y por lo tanto, lo único que queda por hacer, es sacar los frascos o las charolas del liofilizador en condiciones de esterilidad máxima.

PARTE EXPERIMENTAL

El objeto de esta tesis que fué hecha en los laboratorios Dr. Zapata, fué mejorar el proceso de secado, ya que la humedad final era demasiado elevada. Así en el caso de una muestra de suero antialacrán, la humedad final es de 2.45%, en el caso del suero antidiftérico 2.1% y en el de la antitetánica de 1.75%. En cambio en el caso de la glicina no alcanzó una humedad final de 0%; pero este caso es una excepción. Por lo general la humedad final está comprendida entre 1 y 2%; así estas humedades se van a bajar a menos de un por ciento.

Como ya se dijo en el capítulo anterior, el condensador es una placa de metal refrigerada mecánicamente; pero se ha visto que sustituyendo esta placa por un desecante químico se puede bajar mucho la humedad final; claro que en este caso el costo del proceso aumenta considerablemente. Por esta razón se va a tratar de encontrar la humedad adecuada para la substitución de un condensador al otro, con el fin de hacer que el proceso salga lo menos caro posible.

Para encontrar la humedad conveniente, se determinará la humedad de equilibrio ya que cuando la proteína ha alcanzado este valor, no puede tomar agua del medio ambiente; sin embargo este valor en el caso de las proteínas es demasiado elevado. Por esta razón se hicieron unas pruebas tomando como factores el espesor dentro del frasco de la proteína (o su volumen si el área es constante), el tiempo de secado, y las humedades finales obtenidas.

Las humedades halladas fueron graficadas; así se hicieron gráficas de humedad contra tiempo a espesor constante y gráficas de humedades contra espesor a tiempo constante.

En la serie de curvas de humedad contra tiempo se sacaron las derivadas gráficas para encontrar la humedad correspondiente a un punto en el cual, la velocidad de secado es baja. De esta manera se encontraron mejor la humedad para cambiar de condensador y además el mejor espesor dentro de los frascos.

b).—Descripción del aparato.

Como no se puede trabajar experimentalmente con un liofilizador como el descrito en el capítulo anterior se empleó uno que está al aire libre, así que los fracasos se pueden quitar fácilmente. Este liofilizador tiene como el anterior, un condensador y una bomba de vacío, pero en cambio, no tiene placas. Todo el conjunto va montado en una mesa.

Este liofilizador consiste en un tubo de acero con unas bocas o salidas también de acero recubiertas con tubo de hule (aproximadamente 2 cm.) para que puedan entrar los frascos. En nuestro caso hay 16 bocas. Por el otro lado del tubo de acero va conectado a una trampa de vapor que puede ser de cristal o de metal, que se encuentra sumergido en un termo que tiene hielo seco y alcohol que producen una temperatura de -78° . (Ver fig. 3).

c).—Técnica operatoria.

La proteína con la cual se trabajó a lo largo de toda la tesis fué un suero antidiftérico. Se hizo una solución al 8.8% en agua. Una vez que se ha logrado disolver el suero, éste fué conservado con fenol (3 x 1000) y se filtró. Una vez filtrada la proteína en esas condiciones, ya es estable y además queda poco peligro de que se pueda coagular.

Con el fin de tener un control completo, se hizo una determinación de la cantidad de nitrógeno y la cantidad de proteína correspondiente según el método de Kjeldahl, pero con la modificación de Plegl (10), (60), que consiste en usar como catalizador en la digestión sulfato de cobre con

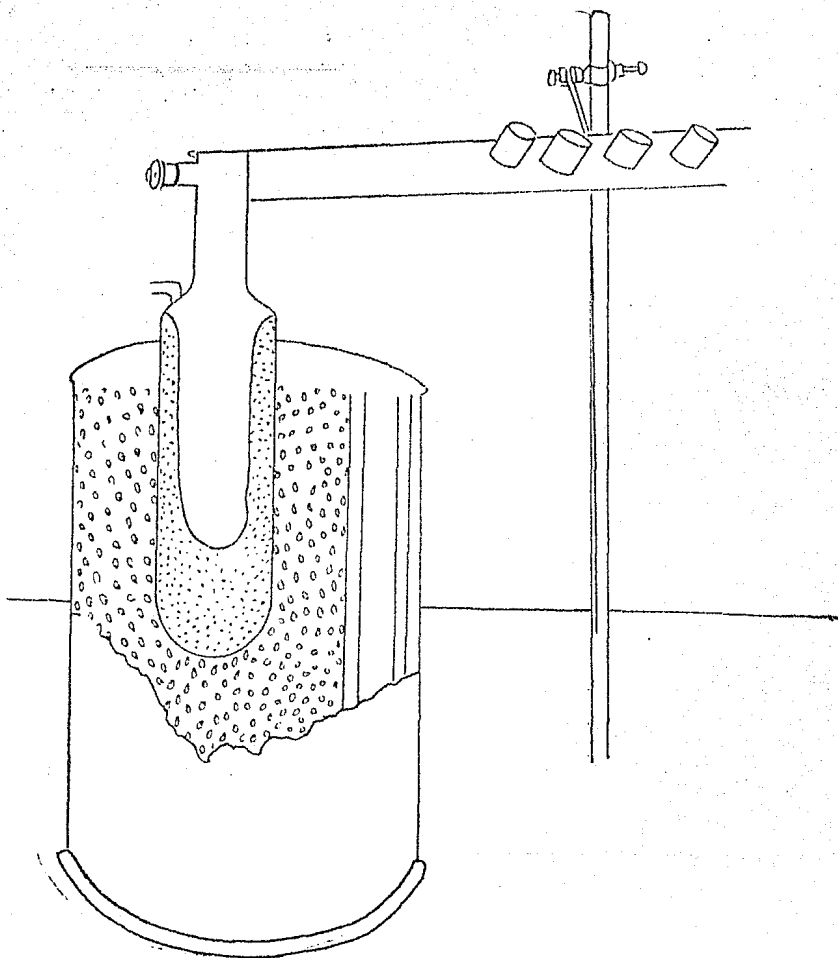


FIGURA 3.—LIOFILIZADOR PARA EXPERIMENTOS.

sulfato de potasio en una cantidad de .072 gr. de selenio por cada cinco gr. de muestra. Para la titulación se utiliza el indicador de Jansen y Anderson que se prepara de la siguiente manera: 100 ml. de solución alcohólica de rojo de metilo al .133%, se añade a una solución alcohólica de azul de metileno al 12.5%.

La cantidad de nitrógeno se aplica la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \% N_2 &= \frac{\text{ml} \times \text{factor} \times 100}{\text{muestra}} \\ &= \frac{12.6 \times 0.005665 \times 100}{0.5} = 1.42 \end{aligned}$$

Para tener la cantidad de proteínas se multiplica por 6.25

$$1.42 \times 6.25 = 8.8 \text{ mg}$$

Como ya se dijo antes, los frascos son iguales con una capacidad de 100 ml. y de boca de 0.8 cm.; los frascos fueron llenados con la proteína en las siguientes cantidades: 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50 mil. Se secó a los siguientes tiempos: 12, 16, 28, 32, 36, 45 hrs. De esta forma se obtuvieron las humedades correspondientes a cada caso que serán tabuladas más adelante.

Para montar un liofilizador del tipo que se acaba de describir primero se congela el producto. La congelación se puede llevar a cabo de dos formas: 1).—por medios externos; 2).—por una evaporación al vacío proceso que se conoce con el nombre de "autocongelación".

En el primer proceso se suele emplear como refrigerante hielo seco ya sea con alcohol, metil celosolve, o bien acetona. El refrigerante va generalmente en una cápsula grande, y la posición de los frascos que se van a congelar en dicha cápsula puede ser cualquiera de las siguientes:

a).—Los frascos se ponen horizontalmente.

b).—Los frascos se ponen en forma de que hagan un ángulo con la base de la cápsula, de modo que el alcohol no pueda entrar a los frascos.

c).—Los frascos se ponen verticalmente de modo que todo el producto quede congelado en la parte inferior del frasco.

d).—Si no se puede usar ninguno de estos tres métodos entonces se usa el método de "shell drying" que consiste en ir girando el frasco dándole la mayor inclinación posible con el fin de que el área de evaporación sea el mayor posible. (25)

En un proceso de secado siempre conviene que el área de secado sea lo mayor posible y el espesor, el menor, por lo tanto el método que más nos conviene, es el último. Sin embargo, se utiliza el método c) con el fin de tener condiciones constantes.

El proceso de autocongelación consiste en una evaporación al vacío. Pero si la proteína se pone directamente bajo un vacío haría espuma. Se puede evitar la formación de espuma de 2 formas: ya sea por degasificación, o bien por congelación por centrifugación. (32), (33), (28), (25)

La degasificación consiste en hacer el vacío lentamente hasta un punto tal, que empieza a hacer espuma. En ese momento ya no se sigue aumentando el vacío, sino que se deja todo el sistema por media hora, tiempo suficiente para que salgan los gases. A continuación se disminuye más la presión y se repite este proceso hasta que poco a poco se llega a la presión final de 2.5 a 1 mm. de mercurio; en ese punto ya no habrá problema con la espuma y la congelación se efectuará inmediatamente. De esta manera se logra congelar sin el uso de ningún refrigerante.

Por el método de congelación por centrifugación se hace girar la botella a una velocidad de 900 r. p. m. en un cuarto que está a -78° . De esta forma se obtiene un cono dentro de la botella, el área de evaporación aumenta grandemente y el espesor se hace menor.

Después de que se ha congelado el producto, los frascos se conectan a las bocas del tubo de acero; este proceso con-

viene que se haga lo más rápidamente posible, ya que muy fácilmente se funde la proteína. Cuando empieza el proceso de secado, al cabo de unos quince minutos, el frasco se ha recubierto de una capa de hielo en la parte externa la cual nos indica que el proceso va bien. Pero si hay fusión, entonces ésta se puede deber a dos razones, una que la congelación no fué suficiente, o bien que entra aire al sistema; éste último se puede saber porque entonces la bomba hace ruido. A medida que transcurre el tiempo, la capa de hielo va cayendo, y para saber cuando acabó la liofilización lo único que hay que hacer es agarrar el frasco en su parte inferior o sea donde está la proteína, si está a la temperatura ambiente se puede tener la seguridad que la liofilización ha terminado.

A medida que la liofilización va pasando, se van sacando los frascos de acuerdo a los tiempos especificados anteriormente. Cuando se va a sacar un frasco se debe de evitar que entre el aire, puesto que esto aumentaría la presión, por esto, entre el frasco y la boca se coloca una pinza y después de sacar el frasco se pone un tapón de hule al que se ha untado con un poco de glicerina; en general es conveniente poner glicerina en todos los tapones del sistema, puesto que el vacío los chupa para adentro, haciendo más hermético el vacío.

Aquí el calor se suministra por el aire que circula por el cuarto de liofilización. Cuando se van a liofilizar frascos con volúmenes bastante grandes, con el fin de evitar que se funda la proteína, conviene que al principio del proceso se meta toda la mesa con el liofilizador en una cámara fría. La cámara tenía una temperatura de 5° y el tiempo en que se dejó en ella fué de 24 horas. Después de este tiempo se sacó el liofilizador y se fueron sacando los frascos, según el tiempo especificado en cada caso.

Determinación de humedades en el producto final:

Para la determinación de humedad final en el producto ya seco, se tiene varios métodos que a continuación se van a mencionar :

- 1).—Destilación con tolueno. (57)
- 2.—Horno al vacío (18) (27)
- 3).—Método de Karl Fisher. (70) (45) (46)
- 4).—Con pentóxido de fósforo al vacío. (18) (27)
- 5).—Estufa con aire caliente. (27)

De estos métodos el que se usó fué el último por ser el más sencillo y el más económico; pero tenía el inconveniente de que es bastante inexacto.

La técnica seguida para la determinación de humedad es la siguiente: Se pone a peso constante un pesafiltro entre 100 y 110^o en una estufa; se saca el pesafiltro. Cuando ya está frío se pesa una muestra de 1 gr. de proteína seca generalmente la cual se vuelve a poner en la estufa por una hora hasta peso constante. Se saca, se vuelve a poner en el desecador y después se pesa. La diferencia en pesos viene siendo la cantidad de humedad.

Determinación de la humedad de equilibrio de una proteína (53)

Para determinar la humedad de equilibrio lo primero que se debe de hacer es determinar la temperatura del bulbo húmedo y la del bulbo seco en el cuarto de liofilización ya que allí es donde se va a trabajar. Con estos datos se va a determinar la humedad que hay en el cuarto de liofilización. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Temperatura del bulbo húmedo = 21.5^o.

Temperatura del bulbo seco = 24.0^o.

Para la presión de México de 585 mm. de presión se encuentra la humedad relativa por ciento correspondiente. Según Urbina la humedad correspondiente es de 78%.

A continuación se busca una substancia tal que, puesto en un recipiente de lugar a una solución sobresaturada que ejerza a la temperatura de 20^o, una humedad relativa de 78%. (53)

Este recipiente que conviene que sea grande o más bien ancho se clooca sobre un vidrio. Al lado de la cápsula se pusieron 4 pesafiltros con la proteína a la cual se le va a determinar la humedad de equilibrio; éstos pesafiltros también convienen que sean anchos y su peso se debe de saber exactamente. El conjunto se tapa con una campana grande, tratando de cerrar el sistema lo mejor posible.

La solución usada fué de tiosulfato de sodio 5H O, cuya solubilidad es en agua de 70g/100 ml. Así que para tener la solución sobresaturada se pesaron aproximadamente 100 gr. de agua tiosulfato.

Como ya se dijo antes, se pesaron 4 muestras de proteína con un peso aproximadamente igual en los 4 casos; los cuatro pesafiltros fueron puestos en el aparato antes descrito, siendo sacados, respectivamente a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las humedades fueron calculadas por el siguiente método:

Los resultados obtenidos están en la siguiente tabla:

Tiempo en horas	24	48	72	96	98
Humedad en lbs. agua/lbs. agua					
más lbs. sólido	23.4	27	30	30	31

c).—Resultados obtenidos

Los resultados obtenidos fueron los siguientes y serán tabulados en las siguientes tablas:

TABLA NUM. 2

FRASCO	VOLUMEN	ESPESOR
Número	ml	cm.
1	10	0.936
2	20	1.425
3	30	2.06
4	35	2.3
5	40	2.78
6	45	3.0
7	50	3.4

A continuación se van a poner las tablas de tiempo contra humedades a espesor constante. Las humedades se van a dar tanto en base seca como en base húmeda, mientras que el tiempo en horas.

TABLA NUM. 2
Espesor 0.936 cm.

Frasco	Tiempo	H. Húmeda	H. seca
1	12	4.5	4.7
1	16	3.9	3.8
1	28	1.67	1.62
1	32	1.62	1.55
1	36	1.55	1.55
1	45	1.55	1.55

TABLA NUM. 3
Espesor 1.425

Frasco	Tiempo	H. húmeda	H. seca
2	12	72	250
2	16	4.94	4.7
2	28	2.15	2.15
2	32	1.55	1.55
2	36	1.55	1.55
2	45	1.55	1.55

TABLA NUM. 4
Espesor 1.425

Frasco	Tiempo	H. húmeda	H. seca
3	12	74	285
3	16	43.7	78.5
3	28	41.1	70.0
3	36	4.15	4.33
3	45	1.63	1.63

TABLA NUM. 5
Espesor 2.5

Frasco	Tiempo	H. húmeda	H. seca
3	32	6.15	6.55
4	12	76	317
4	16	61	170
4	28	57	132
4	32	20	35
4	36	5	25
4	45	1.63	1.63

TABLA NUM. 6
Espesor 2.78

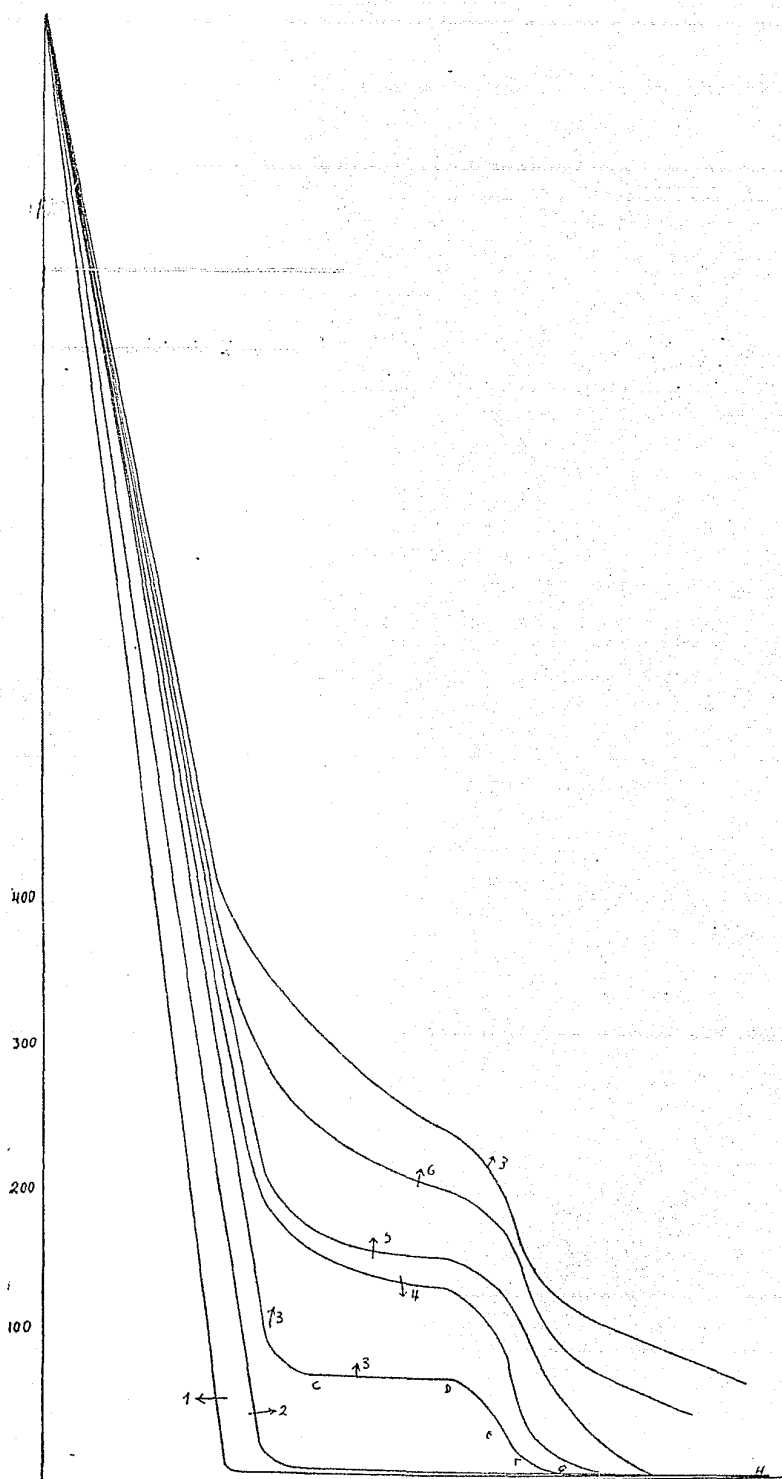
Frasco	Tiempo	H. húmeda	H. seca
5	12	78	355
5	28	61	156
5	32	50	100
5	36	46	85
5	45	3.15	3.15

TABLA NUM. 7
Espesor 3.0

Frasco	Tiempo	H. húmeda	H. seca
6	12	79	376
6	16	73	270
6	28	67	200
6	32	57.5	135
6	36	48	92.5
6	45	35	54.2

TABLA NUM. 8
Espesor 3.4

Frasco	Tiempo	H. húmeda	H. seca
7	12	80	400
7	16	78	355



7	28	70	235
7	32	61.5	160
7	36	52.1	110
7	45	44.5	80

Los resultados tabulados fueron graficados. A partir de estas gráficas se obtuvieron las curvas de velocidad de secado, derivándolas con respecto al tiempo. Una vez encontradas estas velocidades, los valores de éstas fueron graficadas contra el tiempo y contra la humedad.

A continuación se van a tabular los valores de estas velocidades. Las unidades de la humedad van ser kg. agua /kg. sólido secos, las del tiempo horas y las de la velocidad kg agua /kg agua mas kg solidos sus horas.

TABLA NUM. 9

Curva de secado 1

Frasco	Tiempo		Humedad		dH/dT
1	0	12	1007	15	82.6
1	12	12 ³ / ₄	15	5	16.0
1	12 ³ / ₄	16	5	4.7	0.0925
1	16	28	4.7	1.6	0.186
1	28	45	1.6	1.6	0

TABLA NUM. 10

Curva de secado 2

Frasco	Tiempo		Humedad		dH/dT
2	0	15	1007	25	63.2
2	15 ¹ / ₂	17	25	5	8
2	17	28	5	2.15	0.246
2	28	32	2.15	1.55	0.15
2	32	45	1.55	1.55	0

TABLA NUM. 11

Curva de Secado 3

Frasco	Tiempo	Humedad		dH/dT	
3	0	15½	1007	90	61
3	15½	16½	90	74	16
3	16½	28	74	70	0.348
3	28	31½	70	20	14.3
3	31½	33	20	4.3	10
3	33	45	4.3	1.7	0.021

TABLA NUM. 12

Curva de Secado 4

Frasco	Tiempo	Humedad		dH/dT	
4	13¾	0	1007	218	57.5
4	13¾	17½	218	152	14.8
4	17½	28	152	133	2.0
4	28	30½	133	87	18.0
4	30½	31½	87	57	25.0
4	31½	33	57	17	13.9
4	33	36	13	5.25	3.25
4	36	45	5.25	1.63	0.4

TABLA NUM. 13

Curva de Secado 5

Frasco	Tiempo	Humedad		dH/dT	
5	0	13⅓	1007	285	54.3
5	13½	15¾	285	200	30.6
5	15¾	18	200	172	11.4
5	18	28	172	156	1.57
5	28	32	156	100	14.0
5	32	33½	100	57	28.7
5	33½	36	57	15	11.3
5	36	45	15	1.5	1.32

TABLA NUM. 14
Curva de Secado 6

Frasco	Tiempo		Humedad	dH/dT
6	0	12½	1007	350 52
6	12½	17	350	265 19.7
6	17	28	265	200 5.3
6	28	32	200	138 15.5
6	32	36	138	92 11.5
6	36	45	92	54.2 4.2

TABLA NUM. 15
Curva de Secado 7

Frasco	Tiempo		Humedad	dH/dT
7	0	12	1007	400 50.5
7	12	13¾	400	355 25.7
7	13¾	28	355	234 8.5
7	28	32	234	160 18.5
7	32	36	160	116 12.5
7	36	45	110	80 3.3

d).—Discusión de resultados.

Consideremos el caso de un cuerpo poroso, tal como lo es la proteína que se va a liofilizar. Durante la liofilización esta proteína está en contacto con el aire ambiente o con agua caliente; tanto en un caso como en el otro, el calor que se va a suministrar es para la sublimación gracias a una transmisión de calor. Con el fin de estudiar el proceso de secado vamos a considerar la gráfica de dH/dT contra H .

En el transcurso de un proceso de secado, la curva obtenida se puede dividir en cuatro regiones muy características: (1) (6)

a).—Un período inicial, en el cual la velocidad de secado puede aumentar o disminuir rápidamente del valor inicial.

b).—Este período en el cual la velocidad permanece constante por eso se llama período de velocidad constante y la humedad que se tiene al final de este período se llama humedad crítica.

c).—En este período la velocidad de secado baja considerablemente cuando disminuye la humedad.

d).—Este período sigue inmediatamente al anterior, y muchas veces no se distingue claramente del anterior, aunque en la mayor parte de los casos, la velocidad de secado es distinta en los dos casos.

Los períodos 3 y 4 reciben el nombre de períodos de velocidad decreciente.

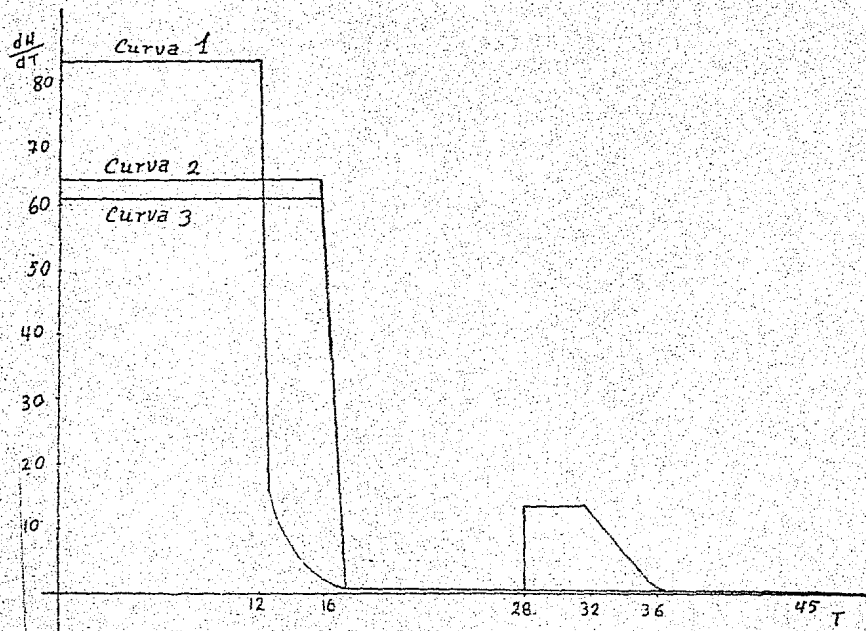
El primer período se caracteriza por ser un período en el cual, el régimen todavía no es constante, puesto que todo el conjunto trata de ajustarse a la temperatura más caliente.

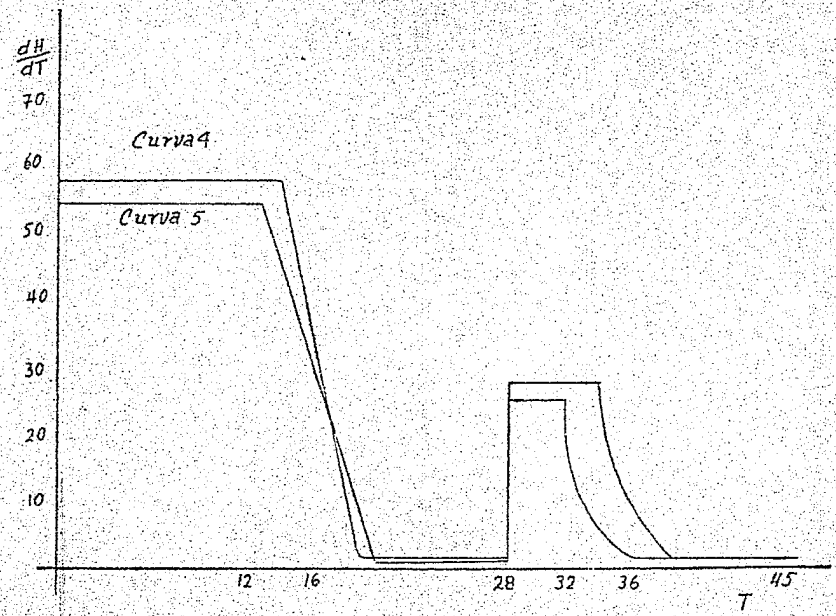
Al principiar la liofilización, el calor se transmite hasta la superficie más fría, que el resto de la masa, ya que además de estar congelada la proteína a tan baja temperatura hay que tener en cuenta el alto vacío. Este calor eleva la temperatura de toda la proteína a un valor tal, que ya se puede sublimar el hielo. Ese calor, además va a hacer que la temperatura de la superficie de la masa congelada aumente. En este período, la evaporación del hielo se debe a la diferencia de potenciales que se establece entre la presión de vapor de la superficie del condensador y la que hay en la proteína.

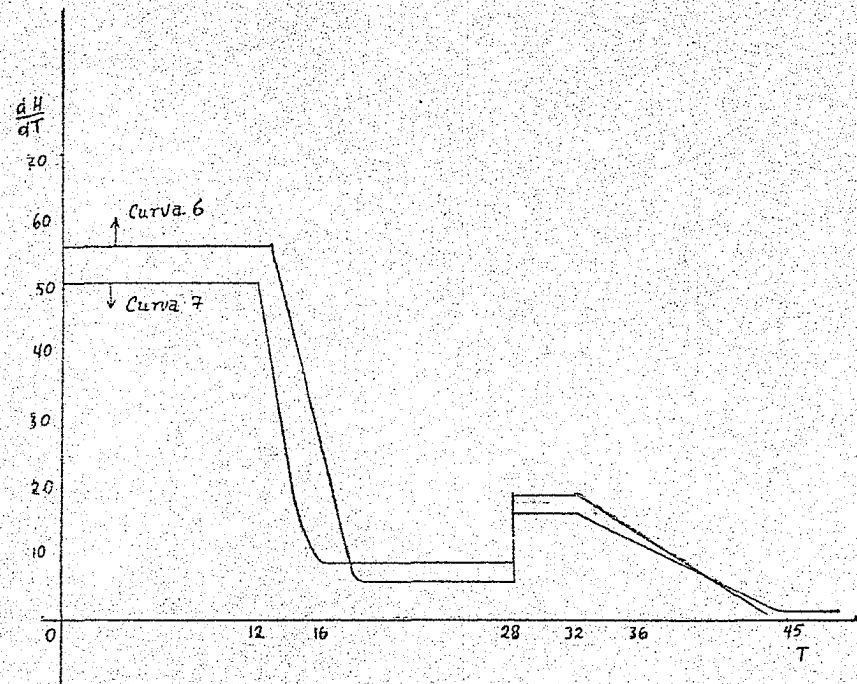
A medida que continúa la liofilización aumenta la temperatura superficial, y al aumentar esta temperatura aumenta la sublimación, disminuyendo además, la velocidad de transmisión de calor. Después de un tiempo que es relativamente corto, la cantidad de calor que se transmite del aire al frasco es igual a la que se necesita para que empiece a fundirse el hielo externo del frasco, se mantenga la temperatura del frasco constante y se suministre el calor necesario para la sublimación.

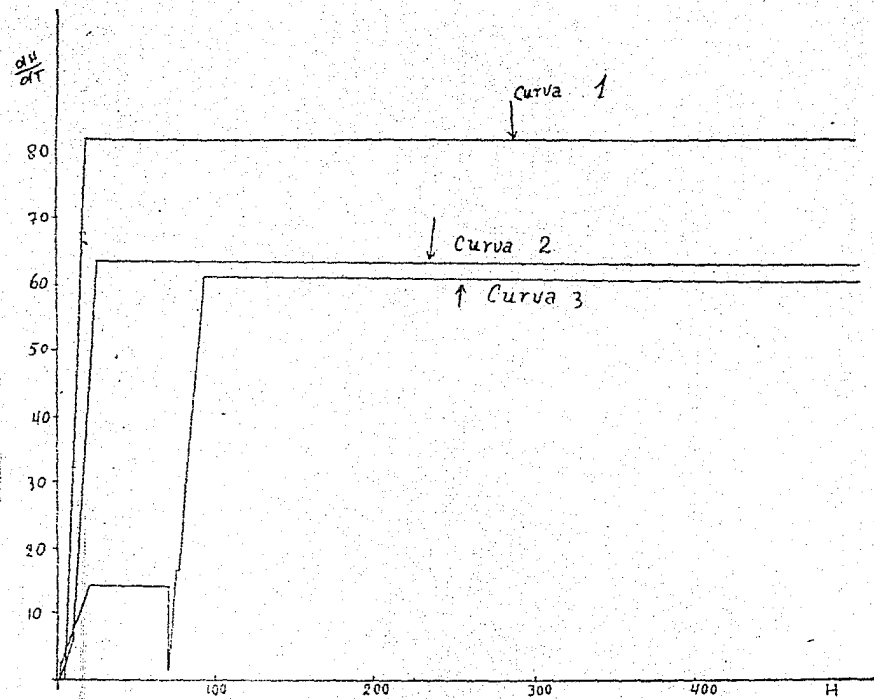
Cuando la velocidad de secado se ajusta a un valor constante, pasamos al segundo período que se caracteriza principalmente, porque la temperatura de toda la proteína es constante. Este período sigue, mientras que haya hielo superficial que se va a sublimar.

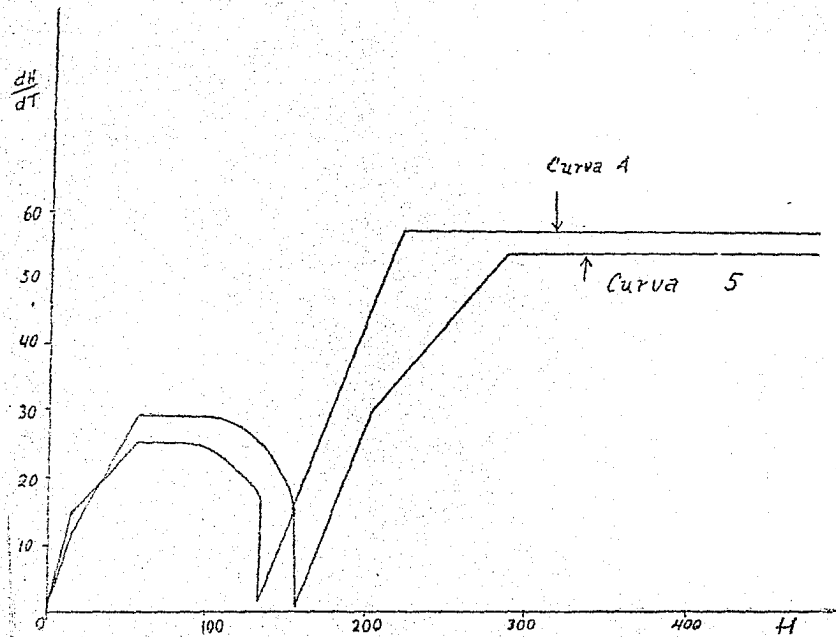
Cuando ya no se puede sublimar a la misma velocidad con la cual se sublimó en los dos períodos anteriores, enton-

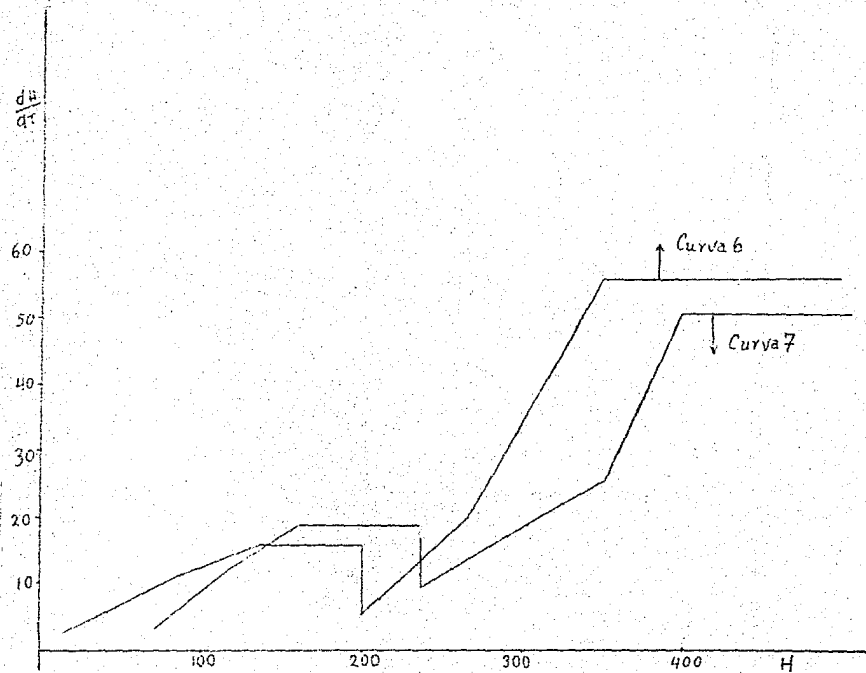












ces llegamos a los períodos 3 y 4. Estos dos períodos se llaman de velocidad de secado decreciente y como su nombre lo indica, se caracterizan principalmente por una disminución considerable en la velocidad de secado. También dependen según fácilmente se puede ver en las gráficas del espesor de la proteína.

Según ya se dijo, el período de velocidad decreciente empieza en la humedad crítica y termina cuando se ha alcanzado la humedad final. Cuando la humedad final es superior a la humedad crítica, entonces todo el proceso de secado tendrá exclusivamente un solo período, el de velocidad constante. Claro que esto sería un caso ideal, pero muy rara vez se encuentra.

El período 3 se caracteriza principalmente por una disminución del hielo en la superficie. En la mayor parte de los casos, este período se caracteriza por una relación lineal entre el hielo que se va a sublimar y la humedad.

El período 4 se debe a que hay una disminución de la difusión del vapor de agua. A medida que disminuye el contenido de agua, se alcanza un punto crítico tal en el cual la resistencia a la difusión interna es mayor que la resistencia que presenta la superficie para la eliminación del agua. En cualquier proceso de secado uno cualquiera de estos dos procesos es el que controla.

Los factores que afectan la velocidad de secado sobre todo si se trata de una liofilización, pueden ser de dos tipos; los relacionados con la transmisión de calor del medio caliente a la proteína o los relacionados con la velocidad del flujo de vapor de agua de la proteína al condensador. En cualquier proceso en que va a haber un flujo hay una regla general que supone que la cantidad de masa o energía por unidad de tiempo es directamente proporcional a la diferencia de potencial que origina el flujo e inversamente proporcional a la resistencia que se opone a dicho flujo.

En el caso de la transmisión de calor, la diferencia de potencial es la diferencia de temperaturas que hay entre la fuente de calor (el aire que hay en el cuarto de liofilización) y

el condensador y la resistencia comprende factores, tales como la película que hay entre el frasco y el medio caliente, la conductibilidad del vidrio, la resistencia que se establece al flujo del calor, por el hecho de que la proteína no está en íntimo contacto con el vidrio del frasco.

En cambio, la diferencia de potencial para el vapor de agua se puede considerar que se debe a la diferencia de presiones que se establece entre el condensador y el frasco. La resistencia al flujo del vapor es una función de la porosidad de proteína, obstrucción que presenta la boca de la botella, el tamaño y forma del secador.(69)

Aunque en la liofilización hay que tomar en cuenta todos estos factores, es sólo uno el que en realidad controla, haciendo el efecto de los demás casi despreciable.

El suero antidiftérico empleado, cuando se congela en un frasco, tiene el aspecto de un sólido blanco amarillento, homogéneo, ocupando cierta altura dentro del frasco. Como en la congelación hay cierta expansión, el suero congelado ejerce una presión contra la pared del frasco. Cuando se empieza la liofilización la primera capa en eliminarse, es la superior, pero a medida que va continuando la liofilización, va bajando el plano de sublimación; pero también hay una sublimación del hielo que se encuentra cerca de la pared. (69) En la última etapa del secado y sobre todo, si el espesor es grande, el vapor de agua que proviene de una capa de hielo de la parte inferior del frasco, llega más fácilmente a un plano cercano a la pared, subiendo allí a lo largo de toda la proteína ya seca y eliminándose en esta forma. Así la última parte del hielo que se va a eliminar se encuentra completamente rodeado de la proteína seca.

Con lo anteriormente dicho, es fácil suponer que la resistencia que se opone, tanto al flujo del calor como al de vapor, cambian a lo largo de todo el proceso; como se ha formado un cuerpo poroso, el calor debe transmitirse a través de este material y el vapor difundirse por él, con el consiguiente retardo de ambas transmisiones.

Es difícil determinar cual de todos los factores antes citados es el que tiene mayor influencia; pero se puede suponer que el que controla es el de la transmisión de calor, ya que éste tiene influencia doble en la liofilización, por una parte regulando la transmisión de calor y por otra el flujo del vapor. Aunque parezca contradicción que el flujo de calor tenga influencia sobre el de vapor se debe al hecho de que debe haber una relación exacta entre la velocidad de transmisión de calor y la de sublimación del hielo. Si ésta se eleva más allá de un valor conveniente se tiene el peligro de que la proteína se funda, pero se tiene la ventaja con ello que se obliga al vapor de agua a salir por la boca del recipiente. Por lo tanto, en el proceso de la liofilización es fundamental controlar el calor que se va a suministrar.

En el período de velocidad constante, el producto se encuentra muy por abajo de los cero grados, si no hay fugas de aire en el sistema, podemos considerar que la presión está comprendida entre 400 y 3000 micrones. En la primera etapa de la liofilización aparentemente la proteína se funde, aun cuando la proteína está bien abajo de los -1° . Sin embargo, si se observa dicha proteína bien, se notará fácilmente que se mantiene perfectamente sólida. Con todo, esto es peligroso y por ello se trabaja en este período a bajas temperaturas. En este trabajo en las primeras 24 horas, todo el liofilizador fué puesto en una cámara de -5° .

En el segundo período, o sea el de velocidad decreciente, la presión baja considerablemente, llegando en la mayor parte de los casos a 100 micrones y aún menos; con un disecante la presión todavía puede ser menor, por ejemplo: el sulfato o el perclorato de magnesio. Una temperatura del condensador de -40° es adecuada y la temperatura del producto se puede subir a 60° aunque esto último no conviene puesto que podría perjudicar a la proteína. En este trabajo la máxima temperatura con la cual se trabajó, fué el ambiente o sea alrededor de 20° .

De las varias curvas de secado de Humedad contra tiem-

po que tenemos, vamos a seleccionar una típica, por ejemplo, la número 3; en ella muy fácilmente se pueden ver todas las etapas del secado; así del punto A al punto B, nos encontramos en presencia de un período de velocidad constante, ya que la humedad baja uniformemente con el tiempo. De B a C la humedad todavía baja un poco, pero de C a D, ya casi la humedad permanece constante. Estos dos períodos vienen siendo los de velocidad decreciente. A partir del punto D, la humedad vuelve a bajar considerablemente hasta llegar al punto E; este período viene siendo el que hemos llamado de régimen no consistente, o sea el primero. Es decir, que en este caso se puede notar fácilmente este período. De E a F, tenemos otro período de velocidad constante, ya que la humedad vuelve a bajar linealmente con el tiempo, y por último, de F a G y de G a H, la velocidad ya casi permanece constante.

De lo anteriormente dicho se ve que estamos en presencia de varios ciclos de secado; lo cual nos indica que acabando un ciclo la proteína ha perdido una molécula de agua, o bien varias de un grupo, terminando con un ciclo de secado inmediatamente empieza el siguiente. Para llegar a una humedad final de 0% se tendrá que pasar por una serie infinita de ciclos de secado; por esto es prácticamente imposible alcanzar estas humedades tan bajas.

Exactamente lo mismo que se ha dicho con respecto a las curvas de humedad contra tiempo, se puede decir de la velocidad de secado contra tiempo (dH/dT vs. T.) y las de velocidad de secado contra Humedad. (dH/dt . vs. H.). En la primera vemos prácticamente que la velocidad de secado permanece constante hasta llegar a las 16 horas con un valor de 62 kg. de agua/kg. agua más kg. sólidos secos, hora. En un intervalo de tiempo pequeñísimo esta velocidad baja muchísimo hasta 0.348 permanciendo constante en este valor hasta las 28 horas, en donde empieza el segundo ciclo de secado yue es igual al primero, sólo que en este segundo ciclo, la velocidad de secado en el ciclo de velocidad constante, ya no es tan elevada como en el caso anterior.

En lo que se refiere a las gráficas de dH/dT contra H

podemos observar que la velocidad permanece constante hasta un punto tal en que la humedad ya ha bajado considerablemente. De allí en adelante tenemos que la velocidad decrece rapidísimamente hasta un punto tal, en que vuelve a subir, lo cual nos indica que ya empezó el segundo período. Incluso en la curva Núm. 5 de la serie de las de dH/dT vs. T se puede ver un tramo de la curva correspondiente al primer período o sea el anterior al de velocidad constante.

Hay un valor diferente de dH/dT para cada espesor en el período de velocidad constante. Ahora bien, cuanto mayor sea el espesor, menor será el valor de dH/dT ; evidentemente, que lo que más nos conviene es un valor de dH/dT lo más alto posible, sobre todo en el período de velocidad constante. Así que, teóricamente el mejor espesor es el primero o sea el de 0.936 cm. ya que a las 12 horas ya tenemos una humedad de 5%; pero no siempre se puede trabajar con un espesor tan bajo.

Si observamos las tablas de Humedades contra tiempo veremos que para cada espesor hay unos puntos críticos difíciles de determinar cerca de los cuales la proteína cambia de aspecto y de estado físico, además. Así en el caso del espesor de 1.425 cm. a las 12 horas, la humedad es de 250%, mientras que a las 16 es de 4.7, ó sea que en un intervalo de 4 horas la humedad ha bajado muchísimo. Cuan el espesor es de 2.78 cm. la humedad es de 85% a las 36 horas, mientras que a las 45 horas, la humedad es de 3.14.

El aspecto de una proteína hasta con un contenido de humedad de 20%, es todavía de un polvo de color blanco. De 25% a 40% el suero tiene el aspecto de una pasta de color café muy pegajoso mientras que de 40% en adelante es un líquido de color café muy viscoso y muy espeso. Por lo tanto, en un intervalo de tiempo, cambia por completo el aspecto físico de la proteína.

En general, si observamos las curvas de secado (las de humedad contra tiempo) tienen una forma parecida a las de

cambio de estado, y ello se debe a que hay un verdadero cambio de estado en la proteína debido a la sublimación.

Otras cosas que también se deben notarse, es que la proteína alcanza un valor mínimo después es muy difícil sino imposible hacerla bajar. Esto es cierto sobre todo para los espesores menores en que la humedad mínima alcanzada fué de 1.55%.

Y por último los dos períodos de velocidad decreciente cambian de aspecto, cuando lo hace el espesor de la proteína. Cuando es espesor es chico todavía, el segundo período es el que controla sobre el primero, o sea que es la difusión la que controla. Pero cuando el espesor ya es mayor entonces es el primer período el que controla sobre el segundo.

e).—Cambios que ocurren durante el secado por sublimación.

Los cambios que puede haber en el producto que se va a liofilizar, son los siguientes: (25)

1).—Físicos.

2).—Químicos

3).—Inmunológicos.

4).—Pérdida de la actividad biológica.

La principal característica de los productos liofilizados es su solubilidad; ésta aumenta considerablemente sobre todo en los soles liofílicos.

En cambio, los cambios químicos muy poco se ha podido notar, prácticamente no hay hidrólisis, ni por supuesto alguna reacción química.

Inmunológicamente, hay pocos cambios en los sueros o antígenos. Así se ha podido mantener intacta albúmina de huevo por 4 ó 5 años.

Generalmente, hay pérdida de actividad biológica únicamente en el caso de los virus; pero ya en el almacenamiento ya no hay pérdida de dicha actividad. En cambio, en el caso de otras sustancias, tales como enzimas, hormonas, penicilinas, no hay pérdidas durante la liofilización ni durante el almacenamiento posterior.

SELECCION DE DESECANTE

Con el fin de bajar la humedad final del producto obtenido, se suele usar un desecante. En este trabajo se hicieron pruebas con tres de ellos que a continuación se van a mencionar: (20)

- a).—Drierita
- b).—Gel de sílice
- c).—Pentóxido de fósforo.

Aunqu e a veces también se han utilizado otros desecantes tales como el perclorato de Magnesio, el óxido de bario. En este caso ni siquiera se probaron, puesta que resultarían económicos.

Un desecante sólido deberá tener las siguientes características: (54)

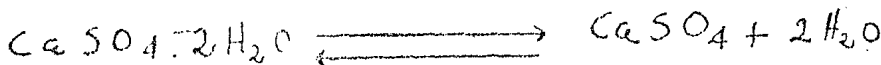
- 1).—El vapor de agua se adsorba rápidamente, o sea que tenga alta actividad.
- 2).—Los desecantes deben ser fácilmente regenerables.
- 3).—El desecante no debe de volverse pastoso ni líquido a lo largo de todo el secado.
- 4).—La resistencia al flujo del gas o del vapor sea mínima.
- 5).—El desecante no cambiará de volumen durante la adsorción, tendrá una densidad aparente elevada, es químicamente inerte, no es tóxico y además debe ser barato.

El carbón activado, la gel de sílice, y la alúmina son de los adsorbentes que tienen sus propiedades de adsorción en la superficie y que se deben a una condensación capilar; en cambio, el sulfato de calcio, el óxido de calcio, el óxido de

f magnésio, y el perclorato de magnésio, son de los adsorbentes que efectúan una reacción química sin perder su estructura rígida.

El primero de los desecantes citados, es la drierita, o sea el Sulfato de calcio anhidro que se obtiene sencillamente por deshidratación completa del hemihidrato o del dihidrato a una temperatura inferior a 300°. Si se sube mucho la temperatura de este valor, se corre el peligro de que posteriormente la drierita ya no adsorba más agua. Después de la deshidratación queda una masa en forma de poros con una resistencia mecánica suficiente para sostener su propio peso.

Si se parte del yeso, la reacción es:



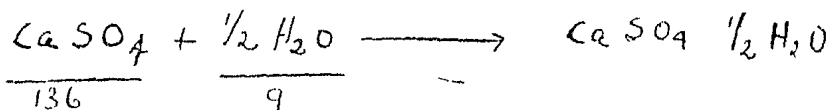
Si se parte del hemihidrato, la reacción es:



La temperatura empleada fué de 230 a 250°, temperaturas que son suficientes para la deshidratación. El material así deshidratado es pasado a un desecador, (ya previamente seco) que contiene una porción del mismo material ya previamente seco. El material una vez frío ya, se puede usar, pero al manejarlo, se debe evitar en lo posible el contacto con el aire húmedo.

Las principales propiedades son las siguientes:

1).—De acuerdo a la reacción química del sulfato de calcio con el agua, vemos que el rendimiento de ésta es bajo cuando va a dar el hemihidrato.



$$\eta = \frac{9}{136} = 6.6\%$$

o sea que se necesitarán 136 kg. de CaSO_4 por cada 9 kg de sulfato de calcio por kg. de agua.

Pero como la regeneración no es completa, se suele considerar únicamente un 75% de la eficiencia total.

$$15.1/0.75=20 \text{ kg. de } \text{CaSO}_4$$

En una liofilización se trabaja con 9 charolas con 3 litros cada una, con una solución de suero al 10%; por lo tanto, tenemos 27 lt. al 10%, vamos a tomar como base de los cálculos los sólidos secos.

$$27000 - 2700 = 24300$$

Como la segunda liofilización se va a empezar con 5% de agua el peso que se va a tener en este caso, es el siguiente:

$$2700 \div 2700 \times 0.05 =$$

$$2700 + 135 = 2835 \text{ gr. totales.}$$

La reacción química por la cual se va a producir el hemihidrato es exotérmica, y por lo tanto se vió que la capacidad máxima antes establecida se debe de reducir a la mitad. Por lo tanto, nos quedará que por cada kg. de agua se necesitan 40 kg. de sulfato de calcio. Si se excede la capacidad anterior, se tiene que la velocidad de adsorción baja mucho; además, el número de veces que se va a emplear el sulfato de calcio conviene que sea máxima, por ello se debe de procurar la elevación de la temperatura sea la menor y que la cantidad de sulfato de calcio la mayor. Por esta razón vamos a reducir la capacidad a un cuarto de la total, o sea que por cada kg. de agua que va a ser adsorbida se va a necesitar 20 kg. de sulfato de calcio.

Como se tenían 135 gr. de agua que se va a eliminar, nos quedará lo siguiente:

$$0.135 \text{ kg } \text{H}_2\text{O} \times \frac{80 \text{ kg de } \text{CaSO}_4}{1 \text{ kg de } \text{H}_2\text{O}} =$$

$$10.7 \text{ kg de } \text{CaSO}_4$$

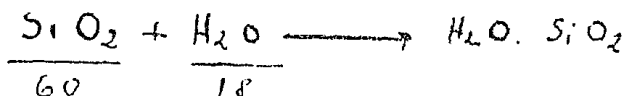
2).—La drierita es de los mejores desecantes en lo que se refiere a velocidad de secado.

3).—La regeneración se suele hacer a una temperatura de 200 — 250° (5).

4).—La fijación del vapor de agua en el desecante es mucho mejor que en el condensador del proceso "Lyophile". Esto se debe a que en el sulfato de calcio hay mucha más área de fijación, puesto que inclusive dentro de él hay fijación y adsorción. Con ello se evita el trabajar a tan altos vacíos. Así en este proceso cuando la presión ha bajado a 1 mm. de mercurio ya empieza a haber liofilización. En cambio, en el proceso "Lyophile", la presión debe de ser 7 y 700 micras; la presión crítica para que se efectúe el proceso es de 700 micras, pero es siempre mejor tenerla a menos de 250 micras. En cambio en el proceso "Cryochem", o sea en aquél en que se emplea la drierita, la presión ideal es de 300 micras, de 600 a 700 micras todavía es buena, mientras que la presión crítica está comprendida entre las 2000 y las 3000 micras.

Un nuevo proceso fué por Hill y Pfeiffer en 1940 en un proceso llamado "Adtevac". (40) Como en los otros métodos también se necesita alto vacío y se presenta el problema de la eliminación del agua. Para este método ellos emplearon un desecante también la gel sílica, la cual tiene un poder de adsorción muy elevado, debido a que es muy poroso.

La capacidad de adsorción es mucho mayor que en el caso de la drierita:



$$\eta = \frac{18}{60} = 30\%$$

La cantidad de vapor de agua adsorbida sobre la gel de sílice, no es sólo una función de la presión existente sino también de la temperatura a la cual se mantiene dicha gel. La principal desventaja es que a cualquier aumento de temperatura, disminuye la capacidad de adsorción y la presión

aumenta. Por eso, los mismos autores idearon un sistema de refrigeración que mantiene a baja temperatura la gel de sílice. Inclusive es mejor ya tener enfriado el desecante antes de empezar la liofilización.

De acuerdo a la reacción química, se necesitarán 60 kg. de gel de sílice por cada 18 kg. de agua adsorbida, lo cual equivale a decir que son 3.33 kg. de sílice por kilogramo de agua.

Para 135 gr. de agua tendremos:

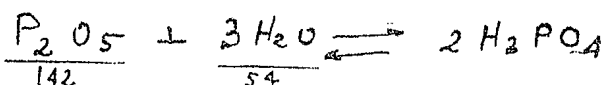
$$0.135 \text{ kg H}_2\text{O} \times \frac{60 \text{ kg SiO}_2}{18 \text{ kg H}_2\text{O}} =$$

$$45 \text{ kg SiO}_2$$

En lo que se refiere a calidad del producto obtenido, el procedimiento es inmejorable, ya que se puede llegar a una humedad final de 0.03% o aún menos.

La gel de sílice es fácilmente regenerable a la temperatura de 400° F. (56), (55), (4), (47). El costo de la operación es bastante elevado, ya que es mejor refrigerar la gel de sílice. Gracias a la gran afinidad de la gel, por el agua se logra que el aparato sea chico, el calor latente que se va a suministrar a la proteína puede ser elevado sin que por ello se funda el producto y lográndose con ello que el tiempo de liofilización se acorte.

El último de los desecantes empleado fué el pentóxido de fósforo. El petóxido de fósforo es un desecante muy enérgico, pero no es muy recomendable, ya que no se puede manejar fácilmente. Su capacidad de fijación del agua es elevada.



La eficiencia es la siguiente:

$$\eta = \frac{54}{142} = 38\%$$

De donde vemos que por cada kg. de agua se necesitan 2.62 kg. de pentóxido de fósforo.

Este desecante es muy difícil regenerarlo, por lo cual ya no se vuelve a usar. Por ello se utiliza solamente en ciertos casos muy especiales.

Después de haber visto los distintos desecantes, podemos sacar como conclusión que por los 0.135 kg. de agua que se van a eliminar, se necesitarán 10.7 kg. de sulfato de calcio, 0.45 kg. gel de sílice, o bien 2.62 kg. de pentóxido de fósforo. Así que el método por el cual se va a utilizar menos desecante es el de la gel sílice; pero también hay que ver si es económico, y además se deberá ver la capacidad de adsorción de éste, en comparación de los demás métodos.

El aparato experimental que se utilizó para hacer estas pruebas fué exactamente igual al empleado para las pruebas del capítulo anterior, sólo que la trampa y el termo substituídos por un quitasato, en el cual se colocó el desecante.

Con el fin de saber el poder de adsorción de los desecantes se hicieron las pruebas de humedad contra tiempo para cada uno. La forma de determinar la humedad fué por el mismo método que se empleó para las pruebas anteriores.

Aquí no se tomó como factor el espesor dentro del frasco ya que se trabajó con una proteína al 5%, siendo la cantidad a secar constante en cada caso o sea 1 gr.

Los resultados obtenidos están dados en la siguiente tabla:

TABLA NUM. 16
 Datos para la gel de sílice.

Frasco	Tiempo	Humedad H.	Humedad Seca
1	1/2	2.85	2.91
2	1	2.5	2.55
3	1 1/2	2.45	2.51
4	2 1/2	2.10	2.15
5	3	1.96	2.15
6	4	1.92	1.942
7	5	1.92	1.942
8	6	1.92	1.942
9	7	1.92	1.942
10	8	1.44	1.47
11	9	1.28	1.28
12	10	1.28	1.28
13	12	0.82	0.82

TABLA NUM. 17
 Datos para el Pentóxido de Fósforo.

Frasco	Tiempo	Humedad H.	Humedad Seca
1	1/2	2.5	2.55
2	1	1.56	1.58
3	1 1/2	1.49	1.52
4	2 1/2	1.4	1.42
5	3	1.4	1.42
6	3 1/2	1.4	1.42
7	4	1.4	1.42
8	5	1.4	1.42
9	6	1.4	1.42
10	7	1.4	1.42
11	8	1.22	1.22
12	9	1.11	1.11
13	10	1.0	1.0
14	11	1.0	1.0
15	12	0.92	0.92

TABLA NUM. 18
Datos para la Drierita

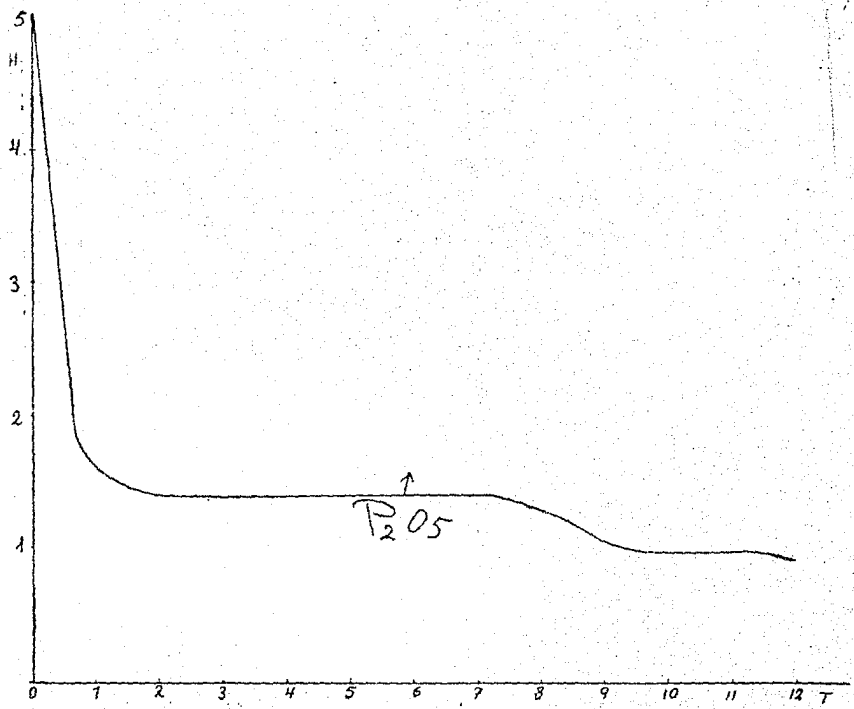
Frasco	Tiempo	Humedad H.	Humedad Seca
1	$\frac{1}{2}$	2.4	2.5
2	1	2.25	2.31
3	$1\frac{1}{2}$	2.1	2.15
4	$2\frac{1}{2}$	1.75	1.78
5	3	1.6	1.62
6	4	1.54	1.52
7	5	1.42	1.42
8	7	0.975	0.975
9	8	0.84	0.84
10	9	0.815	0.815
11	10	0.8	0.8
12	11	0.78	0.78
13	12	0.75	0.75

Los datos de humedades y de tiempo fueron dados en el mismo sistema de unidades que en el capítulo anterior. De los datos tabulados se hicieron gráficas de Humedades contra tiempo.

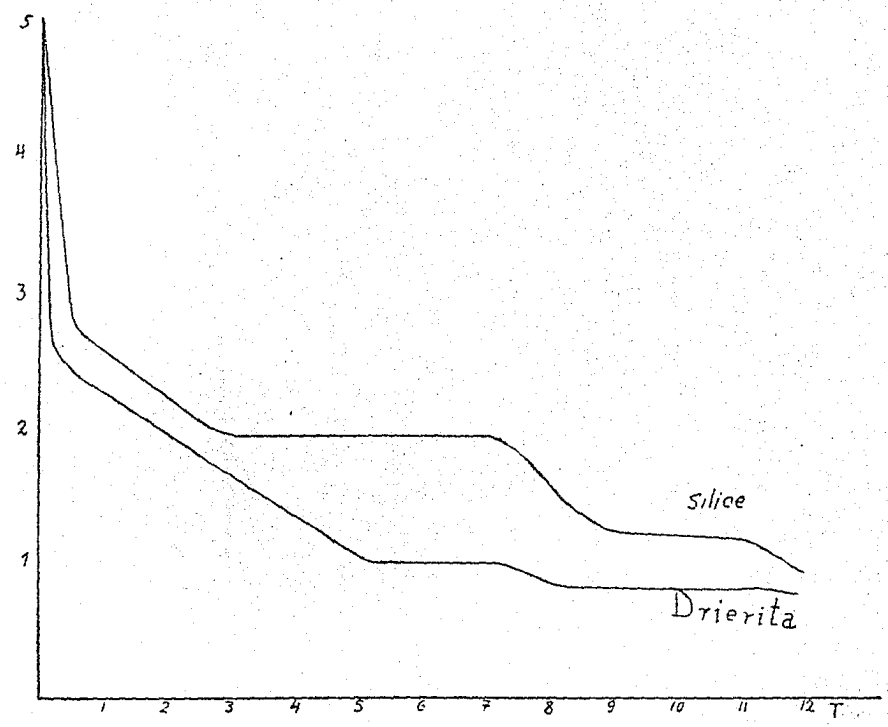
Si se observan estas curvas para cada disecante, veremos que son muy parecidas a las del secado en el proceso "Lyophile". También en ellos se puede localizar con toda facilidad el período de velocidad constante, los dos de velocidad decreciente, empezando inmediatamente un nuevo ciclo de secado.

El desecante que más baja la humedad al cabo de 12 horas, tiempo que se usó para comparar los tres desecantes fué la descrita, ya que alcanza una humedad final 0.75%; como también es el más barato, aunque se necesitara en mayor cantidad éste ha sido escogido.

69



70



DISEÑO MECANICO DEL NUEVO LIOFILIZADOR

El liofilizador que va a tener como adsorbente la drierita consiste esencialmente en un cilindro de acero que en su parte posterior tiene una tapa también de acero soldada al cilindro. En la parte delantera tiene una puerta que puede girar fácilmente. Estas tienen tres ventanitas de modo que se puede ver a través de ellas el interior del liofilizador. Todo el conjunto va montado sobre unas patas de modo que pueden sostener el liofilizador. A continuación se va a hablar del diseño del cilindro y de las tapas dejando para más adelante la descripción del interior del aparato.

Para el diseño y la construcción de recipientes que van a ser sometidos a un vacío, se debe de tomar en cuenta consideraciones teóricas, observaciones experimentales, y datos empíricos, gracias a experiencias ya previamente hechas. En las consideraciones teóricas se toman en cuenta el diámetro, longitud, espesor y las propiedades físicas del material.

Experimentalmente se han hecho unas gráficas para encontrar el espesor; para distintos materiales hay una serie de gráficas que tienen L/D como abscisas y como ordenadas la diferencia de presiones que hay entre el interior del liofilizador y las curvas son de t/D y de esta forma conociendo D , se encuentra fácilmente t . En la explicación anterior L es longitud, D diámetro interno, y t espesor.

El cilindro va a tener las siguientes dimensiones:

Longitud = 90 cm.

Diámetro = 100 cm.

Por lo tanto, la relación de L/D va a valer 0.9.

La presión en la ciudad de México es de 11.35 psi. Vamos a suponer que el esfuerzo de afuera hacia adentro es de 22.7 psi o sea el doble.

El material escogido fué un acero de las siguientes características: Según el código de la A. S. M. E. corresponde a la clase S-1, o sea con un 0.35% de Carbón y 0.8% de Manganeso.

Límite aparente de elasticidad: 27000 psi.

Módulo de elasticidad: 29×10^6 psi.

Relación de Poisson: 0.3.

Factor de seguridad: 5.

Para un valor de p 22.7 psi y L/D 0.9 encontramos un valor de t/D de 0.0043. (38), (65).

Por lo tanto depejando t nos quedará:

$$\begin{aligned} t &= 0.0043 \times D = 0.0043 \times 100 \\ &= 0.43 \text{ cm.} = 0.1692 \text{ pulgada.} \end{aligned}$$

Así que se puede escoger entre un espesor de 1/4 pulgada o bien 3/16 pulgada.

Según Siemon (66), tabla A-12 para recipientes cilíndricos de acero que tienen las siguientes características: Diámetro 42 pulgadas, Longitud 4 pies y una diferencia de presiones de 30 psi. el espesor escogido debe ser 0.0222 pulgadas. Para dar un pequeño margen de seguridad el espesor seleccionado va a ser de 1/4 de pulgada.

ERROR MAXIMO PERMITIDO EN LA CONSTRUCCION

Se llama excentricidad a la diferencia entre los diámetros máximos y mínimos de cualquier plano perpendicular al eje horizontal de un recipiente. Este valor no se debe sobrepasar puesto que pueden producir un defecto en la construcción que hará que el recipiente se rompa.

Para calcular este valor e hay también unas gráficas muy parecidas a las anteriores de t/D como ordenada y

L/D como abscisa; en estas gráficas D es el diámetro externo. De esta forma se obtienen valores de e/t. Despejando e se tiene la excentricidad.

$$L/D = 90/100.63 = 0.895.$$

$$t/D = 0.63/100.63 = 0.00625.$$

Para estos dos valores se obtiene un valor de e 0.58t o sea e = 0.58 × 0.63 = 0.365 cm.

DISEÑO DE LA TAPA DEL LIOFILIZADOR

La tapa o sea lo que viene siendo la parte posterior del liofilizador puede tener muchas formas, ya sea de platos, planas, elípticas, cónicas, etc. De ellas la más sencilla y la más económica es la que tiene forma de plato, por lo tanto es ésta la que se va a emplear.

En las tapas de forma de plato el radio de curvatura de la corona es igual casi siempre al diámetro medio del recipiente. El radio de coyuntura debe tener un valor mínimo que es de 6% del diámetro medio del recipiente y como valor mínimo tendrá 3 veces el espesor de la cabeza.

Para calcular el espesor, tenemos la siguiente ecuación: (37)

$$t = \frac{p R_c W}{2 S e} \text{ ----- (6)}$$

en la cual p es la presión máxima permitida, R_c el radio de corona, W es un factor que depende de la relación de radio de curvatura, al radio medio de la corona, S fuerza tensil unitaria máxima e es la eficiencia de cualquier unión inclusive la de la tapa con el cilindro y t es el espesor. En realidad el espesor que se obtiene es para el caso en que la presión se efectúa del lado cóncavo. Como la presión en realidad se va a efectuar del lado convexo, se tiene que dividir el valor obtenido entre 0.6. (67).

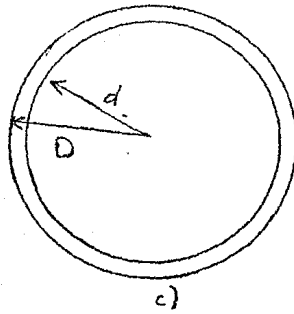
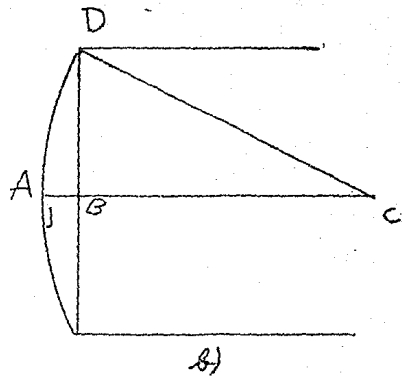
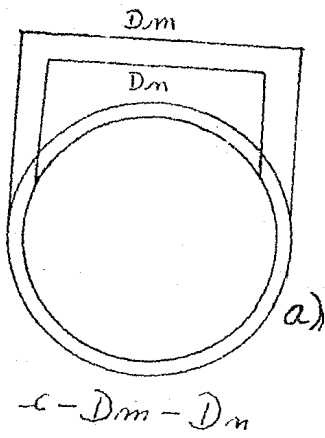


FIGURA CUATRO

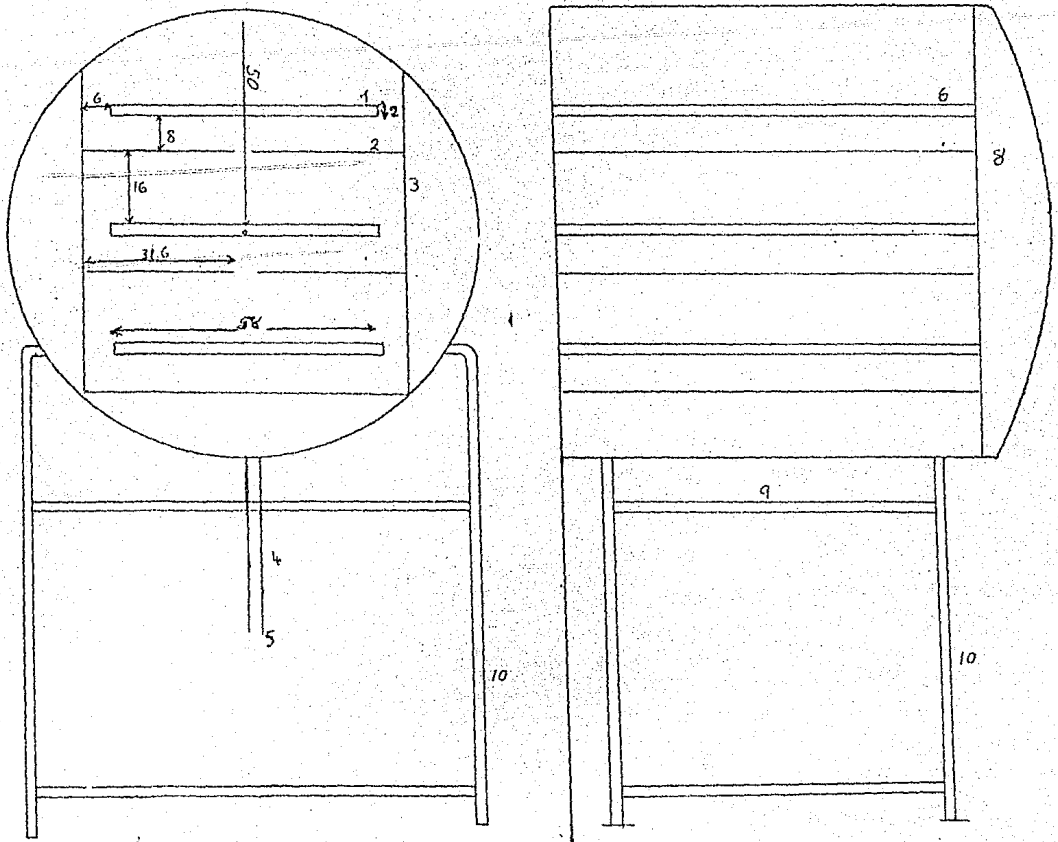


FIGURA 5

- 1.—Charolas con la proteína.
- 2.—Charolas con el desecante.
- 3.—Placa de metal.
- 4.—Tubo de hule.
- 5.—Bomba de vacío.
- 6.—Charolas con la proteína.
- 7.—Charolas con el desecante.
- 8.—Tapa trasera.
- 9.—Soporte.
- 10.—Patas.

También para una relación del radio de curvatura al radio de la corona de 0.06 tenemos un valor de W 18 y por lo tanto, nos quedará:

$$t = \frac{227 \times 40 \times 1.8}{2 \times 11000 \times 0.65} = 0.114''$$

Sin embargo, este valor se va a aumentar a 0.25 con el fin de dar un margen de seguridad. Para comprobar este valor en la tabla A-11 del Siemon tenemos los siguientes datos para cabezas esféricas: Cuando el espesor es de 1/4 de pulgada y el radio de curvatura de 42 pulgadas, la presión permitida es de 47.2 psi.

Cálculo de la tapa del liofilizador.

Para calcular esta tapa, se nos presenta un problema de geometría. (Ver fig. 4-b):

$$AB = AC - BC, \quad DC = AC = 100 \text{ cm}$$

$$BC = \sqrt{DC^2 - DB^2} = \sqrt{100^2 - 50^2} = \sqrt{7500}$$

$$86.5 \text{ cm.}$$

$$100 - 86.5 = 13.5 \text{ cm.}$$

La curvatura de la tapa no puede empezar inmediatamente después del cilindro, sino que se necesita dejar un cierto espacio para que empiece dicha curvatura. Según Hesse (66), esta distancia debe de ser aproximadamente de 1.5 el espesor, o sea más o menos un cm. Así que la profundidad total va a ser de 14.5 cm. aproximadamente.

Cálculo del peso del liofilizador.

Se va a encontrar primero el volumen del cilindro. Este será igual a:

$$\frac{\pi}{4} (D^2 - d^2) \times L =$$

$$0.785 \times (100^2 - 100^2) \times 90 = 8900 \text{ cm}^3$$

Después se va a encontrar el volumen de la tapa. Según Siemon (66), el área de esta parte posterior es de 9.34 ft².

$$93.4 \text{ ft}^2 \times 30.5^2 \frac{\text{cm}^2}{1 \text{ ft}^2} = 8800 \text{ cm}^2$$

Como hay dos tapas, tendremos $8800 \times 2 = 17600 \text{ cm}^2$.

Y el volumen será el siguiente:

$$17600 \times 0632 = 11100 \text{ cm}^3.$$

El volumen total será el siguiente:

$$8900 + 11100 = 20000 \text{ cm}^3.$$

La densidad del acero es más o menos 7.7 gr./cm³.

Así que el peso liofilizador será:

$$\frac{20000 \times 7.7}{1000} = 154 \text{ kg}$$

En cuanto a la descripción de la parte interna del liofilizador, éste va a consistir también en 9 ángulos, ya que los ángulos que van a tener la drierita van a ser dobles, o sea que van a ser en realidad dos ángulos, habiendo una distancia en dirección horizontal entre una y otra aproximadamente de 5 cm.

Según ya se dijo, el liofilizador va a tener una longitud de 90 cm., pero por la tapa posterior esta longitud va a ser más larga sobre todo en el centro. Con el fin de tener siempre la misma distancia se va a poner una lámina de 1/8 de pulgada, la cual, además va a ayudar a sostener las placas. Exactamente se puede decir lo mismo de los lados en donde también se va a poner unas placas con el fin de que el tamaño de las charolas que están en el centro del liofilizador sea igual a las que están más arriba o a las que están más abajo.

El espacio que hay entre las placas del adsorbente es con el fin de forzar el flujo de los vapores, de modo que estos tengan que entrar en contacto con la drierita.

Las principales características, del liofilizador son las siguientes:

Espesor de los ángulos que van a tener las charolas con proteína: 2 cm.

Ancho de estas charolas: 58 cm.

Distancia entre la charola que va a tener la proteína a la que va a tener la drierita: 8 cm.

Ancho de las charolas con drierita: 31.6 cm.

Largo de las charolas con drierita: 90 cm.

Distancia que hay de las charolas que va a tener la drierita a las que van a tener la proteína: 16 cm. La altura de un frasco es alrededor de 10 a 12 cm., así que la distancia considerada es suficiente.

La altura de la drierita dentro de una de estas charolas es la siguiente:

Área de las charolas: $90 \times 31.6 = 2844 \text{ cm}^2$.

En el capítulo anterior ya se dijo que la cantidad de drierita necesaria es de 10.7 kg. Como hay 6 charolas cada una tendrá;

$$\frac{10.7}{6} = 1790 \text{ g}$$

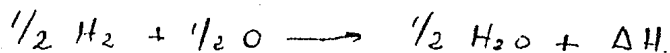
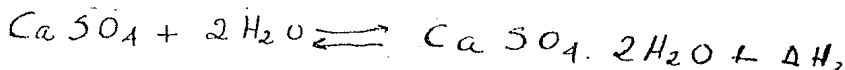
La densidad aparente de la drierita es de 0.65 gr. / cm^3 . Por lo tanto el volumen de la drierita es:

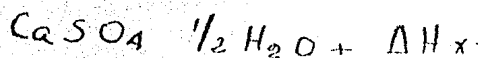
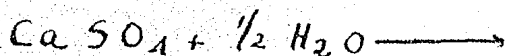
$$\frac{1790}{0.65} = 2750 \text{ cm}^3$$

y la altura será la siguiente:

$$h = \frac{2750}{2844} = 0.975 \text{ cm}$$

Ahora se va a encontrar el calor de formación cuando se forma el hemihidrato.





$$\Delta H_x = \Delta H_2 - \frac{3}{2} \Delta H_1 = -480 + \frac{3}{2}$$

$$\times 603 = -337.6 \text{ kcal/mol}$$

El número de moles que se tiene es insignificante, ya que para 0.135 kg. de agua, tenemos 0.0125 mol. y por lo tanto, el calor que se va a producir es

$$0.00125 \times 377.6 = 0.474 \text{ k. cal.}$$

Así que es e calor, ni se debe tomar en cuenta.

Todo el liofilizador va ir montado en unas patas. El cilindro va a tener dos salidas: una abajo que va a ir conectada a la bomba de vacío por medio de un tubo de hule de 0.8 cm. de diámetro y la otra va a ir hacia un manómetro. Con el fin de evitar que los vapores se escapen hacia la bomba antes de ésta habrá una cajita con drierita, que va adsorber el vapor. La bomba que se va a emplear es de la casa Welch y tiene un motor de 1/2 H. P. Esta bomba va a ir en la parte inferior de todo el sistema, o sea entre las cuatro patas.

CALCULO DE COSTOS

Los gastos que se van a tener en la construcción y en el diseño del liofilizador de que se habló en el capítulo anterior, se van a dividir en dos partes:

a).—Costos en la construcción del aparato que se van a subdividir de la siguiente manera:

1.—Costo de la parte externa del liofilizador . . .	\$ 3,900.00
2.—Costo de dos placas de 72 cm. de ancho por 90 cm. de largo y con espesor de 1/8 pulgada ..	2,000.00
3.—Costo de 1 lámina circular de radio 50 cm. ..	800.00
4.—Una bomba Welch con motor de 1/2 HP	3,780.00
5.—Costo de un manómetro McLeod	3,000.00
6.—Costo de un manómetro común	90.00
7.—6 charolas de 90 cm x 31.6 cm a \$ 60.00 c/u. ..	360.00
8.—9 charolas de 30 cm. x 58 cm. a \$ 65.00 c/u. ..	595.00
9.—Un horno que alcanza temperatura de 400°	1,000.00
10.—3 ángulos con longitud total de 238 cm.	38.60
11.—6 ángulos con longitud total de 211.6 cm. . . .	68.40
12.—Para la base que va a sustentar el liofilizador se ha calculado una longitud total de 11.2 metros con un diámetro de 5 cm. Costando a \$ 16.00 el metro de tubo negro	176.00
13.—Una lámina que va rodear la bomba comple- tamente	60.00
14.—Un termómetro	16.20

15.—Gastos de instalación „ 1,000.00
 Sumando todos estos costos tenemos: \$ 16,084.90.

b).—Depreciación.

Se supondrá una vida del equipo de 10 años y la depreciación se hará mediante pagos anuales considerándose un interés compuesto del 10% anual.

Usando la fórmula

$$a = \frac{C_0 e^{it} (e^t - 1)}{e^{it} - 1}$$

en la cual

a = cantidad depreciada anualmente.

C₀ = capital inicial.

t = años de vida del equipo.

i = interés compuesto.

$$a = \frac{16085 \times 2.71^{1 \times 10} (2.71^{0.1} - 1)}{2.71^{0.1 \times 10} - 1} = \$ 2,820.00$$

Esta cantidad es por año; así que la cantidad que debe depreciarse por ciclo, sin consideramos 150 ciclos al año.

$$\frac{2820}{150} = \$ 18.80$$

c).—Gastos de operación los cuales se originan a medida que va transcurriendo la licofilización; éstos son principalmente:

1.—Se va a tomar como base de los cálculos un ciclo de 36 horas. Ya se calculó la cantidad de drierita que era de

10.7 kg. Pero se va a considerar como si se fuera a usar 12 kg. para estos 12 se tiene que partir de 17.5 kg. de yeso. El kg. de yeso vale \$ 0.90; esta drierita se va a usar para 15 ciclos. Así que el costo por ciclo va a ser:

$$18 \times 90 = 16.20$$

$16.20/15 = \$1.09$ que se va a gastar en drierita por ciclo.

2.—Gastos en corriente eléctrica.

Consumo de la bomba de vacío. Esta es de $\frac{1}{2}$ HP.

$$0.5 \times 36 = 18 \text{ hp.hr.}$$

$$18 \times .0476 = 13.4 \text{ Kw.hr.}$$

$$13.4 \times 0.20 = 2.68$$

Consumo por la estufa. Esta tiene 12 amperes y 120 volts y va a trabajar 4 horas por ciclo.

$$1.44 \times 4 = 5.76 \text{ kw.h.}$$

$$5.76 \times 0.20 = \$ 1.15$$

3.—Gastos en mano de obra por ciclo y suponiendo dos días por ciclo: \$ 30.00

4.—Gastos de lubricante. En cada liofilización se tiene que cambiar el lubricante. Este valdrá \$ 2.25.

Sumando los gastos de operación con la depreciación, nos quedará por ciclo: \$ 45.97.

Como se van a eliminar 135 gr. de agua por ciclo, tenemos que, para eliminar un g. de agua costará:

$$45.97/135 = \$ 0.34$$

RESUMEN

En este trabajo, se describió más o menos a fondo un liofilizador, así como su técnica operatoria, esta descripción fué hecha lo más amplia posible, ya que hay poca literatura sobre el tema, sobre todo en español.

Se trató de mejorar el procedimiento "Lyophile" haciendo que en la parte final del proceso, se emplee un desecante. Claro que las experiencias hechas únicamente son válidas, para un tipo de proteína y por lo tanto, todas las conclusiones hechas, no se pueden generalizar. Además se estudiaron las curvas de secado, viéndose que la mejor será la Núm. 5, ya que ésta en su segundo ciclo de secado presenta mejor velocidad.

También se hizo un estudio comparativo de los tres desecantes, siendo el más económico la drierita aunque éste es requerido en mayor cantidad. El liofilizador con desecante fué calculado y diseñado y tan pronto como sea posible, se procederá a la construcción.

BIBLIOGRAFIA

- 1.--VAN ARSDEL W. B.—Aproximate diusion calculation for the falling rate phsae of drying. **Chem. Eng. Progress** **43**, 10 (Enero 1947).
- 2.--BABOR J. A., THIESSEN G. W.—How to solve problems in Physical Chemistry. Thomas y Crowell. New York. (1949).
- 3.--BARETT A. J. D.—High Vacuum Technology. W. Edwards & Company. London (1949).
- 4.--BARTELL I. E., BOWER J. E.—Adsorption of gases and vapors by silica gel of diferent structure. **I. Colloid Sci.**, **7**, 80-93.
- 5.--BAOUMAN ALFRED.—Investigation of the plaster called soluble anhydrite. **Rev. Materiaux Construct. fran. publi.** N° **390**, 102-4. (1948).
- 6.--BROWN AND ASSOCIATES.—Unit Operations. Jhcn Wiley & Sons. New York. 1950. Pag. 550.
- 7.--BUNT E. A., R. J. CULLOCH.—The design of high vacuum systems. (Segunda parte). **Ind. Chemist.**, **28**, 503-8. (1952).
- 8.--DEL CASTILLO ARTURO.—Tubería soldada de gran diámetro. Informes preliminares del Banco de México, S. A. (1952).
- 9.--CERVERA L. R.—Lioflización de la alexina previamente estabilizada. Tesis. U. N. A. M., E. N. C. Q. Pag. 1-52. (1946).

- 10.—CORONA LEONIDAS.—Tratado de Química Normal y Patológica. Editorial Zig-Zag. Cuarta edición. Santiago de Chile. (1948). Pag. 641-81.
- 11.—DORANTES ARMIDA.—Estudio comparativo de los micrométodos de Kjeldahl y Dumas. Tesis U. N. A. M., E. N. C. Q. (1954).
- 12.—DUNNOYER LOUIS.—Bases theoriques de la disecation dans le vide. *Le Vide* 36, 1077-90. (1951).
- 13.—DUNNOYER LOUIS. Ibid. Pag. 1050-1067.
- 14.—DUSHMAN SAUL.—Scientific Foundations of Vacuum Techonology. John Wiley & Sons. New York. (1949).
- 15.—FLOSDORF EARL W.—High Vacuum measurements. *Chem. & Met. Eng.* 52, 103. (Nov. 1945).
- 16.—FLOSDORF EARL W.—Freeze Drying. Reinhold Publishing Corporation. New York. (1949). Pag. 1-13.
- 17.—FLOSDORF EARL W.—Ibid. Pag. 15.
- 18.—FLOSDORF EARL W.—Ibid. Pag. 47-50.
- 19.—FLOSDORF EARL W.—Ibid. Pag. 52-61.
- 20.—FLOSDORF EARL W.—Ibid. Pag. 203.
- 21.—FLOSDORF EARL W.—Ibid. Pag. 205.
- 22.—FLOSDORF EARL W.—Advances in drying by sublimation, blood, plasma, pennicilins, foods. *J. Chem. Educ.*, 22, 470-80. (1945).
- 23.—FLOSDORF EARL W.—Freeze drying as applied to pennicilin, blood, plasma and orange juice. *Chem. Eng. Progress* 43, 343. (Julio 1947).
- 24.—FLOSDORF EARL W., MUDD S.—Drying pennicilin. *Am. J. Med. Sci.* 209, 694-5.
- 25.—FLOSDORF EARL W., HALL W. L., MUDD S.—Drying by sublimation. *J. Immunology* 59, 21-24. (1945).
- 26.—FLOSDORF EARL W., STOKES F. J., MUDD S.—The desivac for wroying from the frozen state.—*J. Am. Med. Ass.* 115, 1095. (1940).
- 27.—FLOSDORF EARL W., WEGSTER G. W.—The determination of residual moisture in dry biological substances. *J. Biol. Chem.* 121, 35-39. (1937).

- 28.—GARTNER W. A. ERCHMAN F. S.—Principles of food freezing John Wiley & Sons. New York (1948).
- 29.—GLASTONES SAMUEL.—The Elements of Physical Chemistry D. Van Nostrand Co. Inc. Pag. 94-99. (1950).
- 30.—GREAVES R. I. N.—The preservation of proteins by drying Medical research Council. London. (1946). Pag. 1-19.
- 31.—GREAVES R. I. N.—Ibid. Pag. 19-27.
- 32.—GREAVES R. I. N.—Centrifugal Vacuum freezing. *Nature* **153**, 485-7. (1944).
- 33.—GREAVES R. I. N.—Production of blood derivatives to meet war requirements. *J. Am. Med. Assn.* **124**, 2, 76-9. (1944).
- 34.—GRIFFIN W. C.—Higroscopicity of softened glue compounds. *Ind. Eng. Chem.* **37**, 11. (1947).
- 35.—HAMMOND W. A., WITHROW J. R.—Soluble anhydrite as a desiccating agent. *Ind. Eng. Chem.* **25**, 655. (1933).
- 36.—HARTMAN F. W. y HARTMAN F. W., JR.—The use of cellophan cylinders for desiccating blood plasma. *J. Am. Med. Assn.* **115**, 1989. (1940).
- 37.—HESSE HERMAN.—Process design equipment. D. Van Nostrand Co. Pag. 68. New York. (1949).
- 38.—HESSE HERMAN.—Ibid. Pag. 528.
- 39.—HIGH VACUUM CATALOGUE, E. LYBOLD NACHFOLGER. Köln. Bayenthal. (1952).
- 40.—HILL J. M., PFEIFFER D. C.—The Adtevac process. *Ann. Int. Med.* **14**, 201. (1940).
- 41.—JIMENEZ, EMILIO.—Química General. Editorial Sacta. Madrid. Pag. 289 (1941).
- 42.—KARRER PABLO.—Tratado de Química Orgánica. Editora Nacional. México, D. F. (1946). Pag. 354-7.
- 43.—KEYES D. B., DEM. A. G.—Chemical Engineering Handbook. John Wiley & Sons. 1946. New York. Pag. 183.
- 44.—LEDOUX EDUARD.—Dynamic coloring of absorbents. *Ind. Eng. Chem.* **40**. 1970. (1948).
- 45.—LEVY G. B. MORTAUGH J. J., ROSENBLUTT M.—Microdetermination of water. *Ind. Eng. Chem. Anal.* **17**, 3, 593. (1945).

- 46.—MAC KINNEY C. D., HALL R. T.—Improved electrometric method for use with the Karl Fisher method for determination of water. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **15**, 7; 460 (1943).
- 47.—MILLIGAN W. O., RACHFORD H. H., JR.—The sorption-desorption Hysteresis characteristics of the system $\text{SiO}_2 - \text{H}_2\text{O}$ below the freezing point of water. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2923. (1945).
- 48.—MORSE M.—High Vacuum Technology. *Ind. Eng. Chem.* **39**, 1064. (1947).
- 49.—NORD MELVIN. Sublimation. *Chem. Eng.* **58**, 9, 157-66. (Septiembre, 1951).
- 50.—PERRY JOHN H.—Chemical Engineering handbook. Mac Graw-Hill Book Co. Edition 1940. Pag. 8065.
- 51.—PERRY JOHN H.—Ibid Ed. 1950. Pag. 660.
- 52.—PERRY JOHN H.—Ibid. Ed. 1950. Pag. 1280.
- 53.—PERRY JOHN H.—Ibid. Ed. 1950. Pag. 810.
- 54.—PERRY JOHN H. Ibid. Ed. 1950. Pag. 880.
- 55.—PAPEE DENNIS.—Sur l'adsorption de vapeur d'eau par l'alumine et la silice. *Comptes rendus des Seances de L'Academie de Sciences*, tome 234, Núm. 9. Pag. 952.
- 56.—PAPEE DENNIS.—Sur la retention de vapeur d'eau par l'alumine et la silice. Ibid. Pag. 2536.
- 57.—Remington's Practice of Pharmacy; The Mack Publishing Co. Easton Pa. Pag. 1061. (1942).
- 58.—RIEGEL EMIL RAYMOND.—Chemical Machinery. Reinhold Publishing Corporation. New York. Pag. 414.
- 59.—RIESENFELD E.—Tratado de Química Inorgánica. Marín Editor. Barcelona. (1942). Pag. 294.
- 60.—SCOTT WILFRED W.—Standard Method of Analysis (vol. 2). D. Van Nostrand Co. New York. (1944). Pag. 2492.
- 61.—SHREIDER A. L., COTTON R. H.—Dehydration of Orange juice. *Ind. Eng. Chem.* **40**, 803.
- 62.—Stokes Microvac for high Vacuum; catalogo 700, Philadelphia 20 Pa.

- 63.—Stokes Microvac pump model F; Stokes Machine Co. Philadelphia 20 Pa.
- 63.—Stokes Microvac pump modle F; Stokes Machine Co. Philadelphia 20 Pa.
- 64.—Stokes High Vacuum Mac Loed Type. Flosdorf modification. Operating instructions. Phyladelphia Pa.
- 65.—STRUMIA MAX.—The preparation of blood plasma, Refrigeratin Data Book. Applications. Cap. 37. Pag. 01-13. (1952).
- 66.—SIEMON KARL.—Manual for the design of ferrous and non ferrous pressure vesseils and tanks. Edward Brother, Inc. Am. Arbor. Michigan. (1946). Pag. 61.
- 67.—SIEMON KARL.—Ibid. Pag. 246.
- 68.—SIEMON KARL.—Ibid. Pag. 80.
- 69.—SHERWOOD.—Studies with pennicilin. Personal Comunication to Flosdorf. Freeze Drying. Reinhold Publishing Corporation. New York. (1949). Pag. 230-9.
- 70.—ARTHUR THOMAS.—Laboratory Apparatus and re. agents. (1950). Pag. 563-5.
- 71.—WALKER W.—Principles of Chemical Engineering. MacGraw Hill books Co. New York. Pag. 68.
- 72.—WALKER W.—Ibid. Pag. 629-30.
- 73.—WEISSER HARRY B.—Colloid Chemistry. John Wiley & Sons. Inc. (1947).
- 74.—WILKINSON N. J.—Continuos method o drying plasma and Serum. **The Lancet** 281. London. (1942).
- 75.—WEINGARTNER H. C.: Design of high Vacuum Engineired plants **Ind. Eng. Chem.**, 40. 5, (1948). Pag. 780.
- 76.—WICKOFF R. W. G., LAGODIN J. B.—A simple outfit for drying plasma form the frozen state. **Am. J. Clin. path.** 8, 10 (1944).
- 77.—ZAMKOV, W. H., MARSHALL W. R.—Freeze Drynig with radiant emergy. **Chem. Ens. Prog.** 48, 21 (Enero, 1952).