TRABAJO DE REVISION/
REVIEW ARTICLE

ASPECTOS FISICOS RELACIONADOS CON LOS ADITIVOS EN EL PROCESO DE LIOFILIZACION. PAPEL RELEVANTE DE LOS CARBOHIDRATOS

Tomás Moreira, Aurora Gutiérrez, Herminia Delgado

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y Calle 158, Apartado 6880, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en agosto de 1993. Aprobado en noviembre de 1993

Key words: Freeze-drying, structure collapse, additives, carbohydrates

SUMMARY

It was analyzed the importance of the proper additives' selection (mainly carbohydrates) for obtaining a good appearance and long term stabilization of freeze dried products.

Theories about the protective function of such additives from chemical and physical points of view are discussed. The most recent methods for characterizing physical phenomena during freeze-drying in order to make stability predictions, to select appropriate additives mixtures and freeze-drying parameters are also exposed.

RESUMEN

Se realizó una revisión y actualización sobre la importancia de la selección adecuada de aditivos para lograr tanto una buena apariencia como una estabilización prolongada de diferentes sustancias liofilizadas; se hace énfasis en el papel de los carbohidratos.

Se discuten las teorías acerca de la función protectora de estos aditivos desde los puntos de vista físico y químico, así como los métodos más actuales de determinación de parámetros característicos de los fenómenos físicos que tienen lugar durante la liofilización, con vistas a seleccionar las mezclas de aditivos más adecuadas y a disponer de criterios sobre la estabilidad durante el almacenamiento.

INTRODUCCION

La forma deshidratada constituye la vía más apropiada para conservar productos perecederos (alimentos, productos biológicos o farmacéuticos), ya que la baja actividad de agua en ellos minimiza cualquier reacción de deterioro (Simatos y Karel, 1988). Los métodos tradicionales de secado tropiezan con el inconveniente de que el producto tratado está sometido, aunque sea por muy corto tiempo, a la acción de elevadas temperaturas, que son más dañinas en estadíos intermedios del secado. Recientemente se ha desarrollado un método basado en la estabilización de productos termolábiles mediante el secado por evaporación de las sustancias en estado vítreo (Franks *et al*, 1991), pero la tendencia universal es emplear la liofilización para deshidratar productos termolábiles, puesto que la misma se efectúa a bajas temperaturas. Sin embargo, resulta sorprendente que muchas personas que utilizan esta técnica desconocen los principios que la rigen y por tanto, la importancia de realizar una selección apropiada de los constituyentes de la formulación antes de aplicarla.

Vale recordar que el primer paso a tener en cuenta al liofilizar es la congelación: al disminuir la temperatura del sistema, el agua cristaliza y los demás componentes se concentran en los intersticios que se forman entre los cristales de hielo. Una buena parte de los productos que se liofilizan van acompañados de reguladores del pH o simplemente de sales remanentes del proceso extractivo. También encontramos mezclas complejas (como en alimentos, sueros, etc) o microorganismos resuspendidos en un medio previamente seleccionado. Algunos de los componentes, al concentrarse durante la congelación, pueden cristalizar formando eutécticos y otros se mantienen líquidos, llegando a solidificar en estado amorfo (Levine y Slade, 1988). La hiperconcentración en los intersticios puede provocar la disminución de las características biológicas, farmacéuticas o nutricionales de las sustancias presentes, debido fundamentalmente a la proximidad de los electrolitos a las proteínas (Pikal, 1990).

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

En el caso de sistemas celulares, los cambios pueden llegar a ser irreversibles a nivel de las membranas, provocando pérdida en las funciones de las células e incluso la muerte (Nei, 1973). También se han observado afectaciones en el ADN (Ashwood-Smith y Grant, 1976) aunque algunos trabajos reportan la reparación de estos daños (Ohnishi *et al.*, 1977).

Un producto liofilizado deberá mantener prácticamente intactas sus características fundamentales, así como tener apariencia agradable, bajo contenido de humedad, fácil rehidratación y estabilidad durante el almacenamiento prolongado. Por otra parte, el proceso debe llevarse a cabo en el menor tiempo y con un consumo mínimo de energía. Para lograr estos objetivos, debe existir un control completo de los parámetros de operación (congelación, sublimación, desorción). La influencia de estos parámetros ha sido abordada por otros autores (Pikal *et al.*, 1990; Franks, 1990; Willemer, 1991). Sin embargo, estos parámetros no pueden ser regulados en niveles económicamente aceptables si las características del material no lo permiten. La composición química de una formulación dada está íntimamente relacionada con su termolabilidad (Moreira, 1976). Por tal razón, en este trabajo pretendemos hacer énfasis en la influencia de los aditivos y fundamentalmente de los carbohidratos, en cuanto a las características físicas de las formulaciones durante la congelación y la deshidratación.

PAPEL DE LOS ADITIVOS

Los aditivos o lioprotectores son sustancias que se añaden con el objetivo de mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización y/o el almacenamiento. Se conoce que los azúcares, polioles, algunas sales, aminoácidos y sustancias proteicas son capaces de cumplir con estos objetivos. De ellas, el grupo más estudiado ha sido el de los carbohidratos y sus derivados.

En el campo de los productos farmacéuticos y de los biopreparados, existen aditivos como el manitol, llamados *de carga,* cuya función esencial es aparentar la presencia de mayor cantidad de sustancia activa y brindar mejor aspecto al producto final (Simatos *et al.*, 1974; Hora *et al.*, 1992).

Sin embargo, otras sustancias juegan el papel de verdaderos reguladores de la deshidratación. Por ejemplo, la duración del proceso de liofilización de un jugo de frambuesa despectinizado resultó ser de 31 h, mientras que al adicionarle sacarosa, se redujo a 22 h. Al añadirle al jugo una cantidad de pectina, el tiempo de liofilización fue sólo de 15 h (Moreira *et al.*, 1974). En este caso, ambos aditivos ayudaron a incrementar la viscosidad del retículo intersticial y, por tanto, a facilitar el empleo de temperaturas superiores para acelerar tanto la sublimación del hielo como la desorción de las *venas* intersticiales (King, 1973). La composición química de una solución determina pues, la resistencia que la misma ofrece a ser liofilizada.

Cuando la temperatura del producto se incrementa en aras de acelerar el proceso de sublimación, existe un valor crítico por encima del cual ocurre el fenómeno de hundimiento de estructura (en inglés structure collapse), caracterizado por la interrupción de la sublimación, pérdida de rigidez del retículo intersticial y en ocasiones ebullición y burbujeo. Este fenómeno implica no sólo una mala apariencia final del material sino también una deshidratación incompleta y una pérdida de la actividad de la sustancia que se liofiliza.

Dicho fenómeno se puede caracterizar determinando los cambios de velocidad de sublimación (Bellows y King, 1972), realizando la liofilización bajo el microscopio para observar el fenómeno primario (MacKenzie, 1985) o mediante la observación directa de la afectación del aspecto (Ito, 1970).

La tabla 1 muestra la variación del tiempo necesario para la aparición del hundimiento de estructura de diferentes soluciones modelo liofilizadas simultáneamente partiendo de una temperatura de -60°C y con aporte de calor creciente a través de la *capa seca* (Moreira y Simatos, 1977).

Tabla 1
Influencia de la composición química sobre la aparición del hundimiento de estructura durante la liofilización de diferentes soluciones

Composición de la solución (% Peso/Volumen)				Tiempo necesario para que aparezca el hundimiento de estructura (minutos)
A	F	G	S	
10	0	0	0	24
7,5	0	0	2,5	48
0	10	0	0	54
5	2,5	0	2,5	78
0	0	10	0	79
0	5	2,5	2,5	102
5	0	0	5	134
0	0	5	5	150
2,5	0	2,5	5	176
0	0	2,5	7.5	240
0	0	0	10	270

A: Acido cítrico F: Fructosa G: Glucosa S: Sacarosa

Como se observa, los tiempos necesarios para la aparición del hundimiento de estructura son menores cuando predomina la presencia de ácido cítrico en la solución y mayores cuando se incrementa la proporción de sacarosa, indicando que este azúcar confiere más rigidez al retículo intersticial que el ácido. La fructosa y la glucosa presentan un comportamiento intermedio siendo la primera el azúcar que más dificulta el proceso de liofilización, entre los tres estudiados. El comportamiento de las mezclas responde de forma proporcional a la relación entre los componentes presentes.

Los primeros trabajos de Rey (1964) sobre la importancia de la composición química en la liofilización, hacían referencia a la temperatura de fusión de las venas intersticiales, como valor crítico por debajo del cual debía mantenerse el producto durante el proceso. También señalaba a la temperatura de fusión incipiente, definida como aquella a la cual comenzaba la fusión de los cristales de hielo. El análisis térmico diferencial (ATD) y las determinaciones de la resistencia eléctrica constituyeron la base de sus investigaciones.

La importancia de la fusión de las *venas* intersticiales, cuando estas cristalizan en forma eutéctica resulta un hecho inobjetable. Sin embargo, la teoría de la fusión del hielo en equilibrio con una fase amorfa en las *venas* intersticiales, aunque desde el punto de vista teórico explica algunos fenómenos como la aparición del hundimiento de estructura al liofilizar bajo el microscopio (MacKenzie, 1975; Moreira, 1976), presenta limitaciones cuando a través del producto existen gradientes de temperatura importantes o cuando entre los componentes de la sustancia intersticial amorfa figuran macromoléculas que no actúan sobre la temperatura de fusión del hielo en equilibrio con dicha fase amorfa.

Es así como Diallo (1978), trabajando sobre una solución modelo compuesta por cantidades idénticas de ácido cítrico, fructosa, glucosa y sacarosa, encontró que la temperatura a la que llamó de desvitrificación o de recristalización, determinada por calorimetría diferencial de barrido (CDB), coincidía con la de hundimiento de estructura en una liofilización bajo el microscopio. Sin embargo, al adicionar pectina y albúmina a la solución, a pesar de que la temperatura de desvitrificación no variaba, la de hundimiento de estructura se incrementaba en 9 y 11°C respectivamente.

La teoría de King (1973) que describe el fenómeno de hundimiento de estructura en función de la viscosidad intersticial, así como los aportes de Karel (1975) en cuanto a la posibilidad de que éste se produjera en la *capa seca*, ayudaron a la mejor comprensión del fenómeno y a su control mediante la presencia de aditivos apropiados.

Maltini (1974, 1977) al igual que MacKenzie (1966, 1985) profundizaron en las relaciones existentes entre las determinaciones termofísicas durante la congelación mediante ATD, CDB y DTC (dinamometría con temperatura controlada), como métodos de predicción del comportamiento de los productos durante la liofilización.

Estos trabajos sirvieron de base a la nueva teoría, desarrollada por Franks (1985), relacionada igualmente con la viscosidad de la sustancia intersticial, pero esta vez basada en la determinación de la temperatura de transición vítrea o paso del estado de sólido amorfo al de sustancia gomosa al atravesar la barrera de los 10^{14} Pa.s y reducir su viscosidad por efecto del incremento de la temperatura.

La figura 1 muestra el *diagrama de estados* glucosa-agua determinado en nuestro laboratorio mediante el empleo del ATD. En él se observa la curva de equilibrio hielo-solución de glucosa (M), la curva de isoviscosidad o de transición vítrea (G), así como los fenómenos AM e IM. El evento térmico denominado

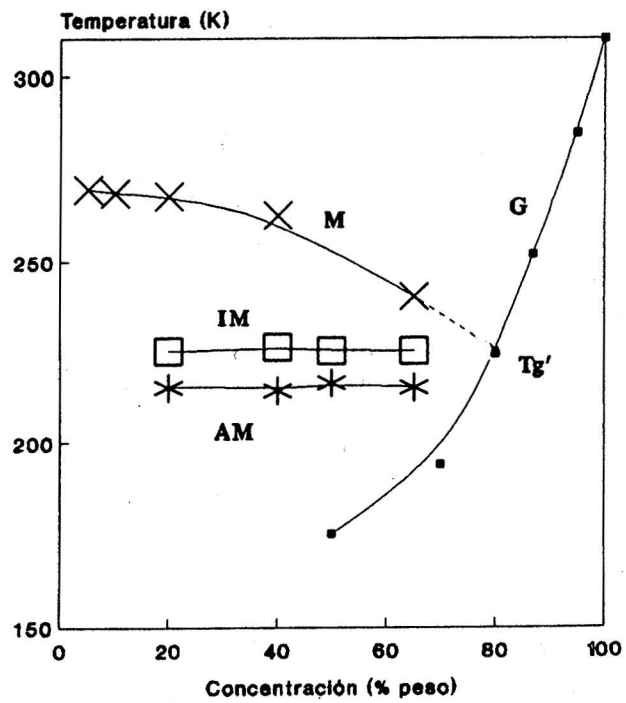

Fig 1. Diagrama de estados del sistema glucosa-agua: M: Curva de fusión del hielo, G: transición vítrea, IM: incipient melting, AM: ante-melting. En la figura se indica el posible valor de Tg', según la definición de este punto por Franks (1985).

IM (incipient melting) ha sido interpretado por la mayoría de los autores como característico del inicio de la fusión de los cristales de hielo, mientras AM (ante-melting) se ha asociado a una recristalización previa a la fusión (MacKenzie, 1966) o al resultado de la superposición de eventos de cristalización y fusión en diferentes zonas de la sustancia intersticial (Maltini, 1977).

La nueva teoría (Franks, 1985; Levine y Slade, 1987; Franks *et al.*, 1991) señala que en la intersección de las curvas M y G se encuentra Tg', la temperatura de transición vítrea de la sustancia intersticial cuando ésta alcanza la concentración máxima debido a la crioconcentración a la que se somete durante la congelación. Para estos autores Tg' es la temperatura que caracteriza un sistema dado.

En nuestros trabajos iniciales acerca de la influencia de la composición química sobre la liofilización (Moreira 1977, 1981), encontramos que la temperatura de hundimiento de estructura observada bajo el microscopio se situaba entre las temperaturas AM e IM determinadas por ATD.

La Tabla 2 relaciona nuestros resultados sobre la temperatura de hundimiento de estructura observada bajo el microscopio, así como los valores de AM e IM obtenidos por ATD. Se muestran igualmente los valores de Tg' reportados por Levine y Slade (1987).

Tabla 2
Temperaturas de hundimiento de estructura (THE), AM, IM y Tg' (en °C) observadas para las diferentes soluciones

Sustancia	THE	AM	IM	Tg'
sacarosa	-32	-39	-32	-32
glucosa	-42	-52	-42	-43
glucosa/fructosa	-47	--	--	-42.5
fructosa	-45	-52	-42	-42
lactosa	-28	-35	-28	-28
ácido cítrico	-55	-59	-50	--
glutamato de sodio	-50	--	--	-46
gelatina	-8	-11	--	-9.5
sorbitol	-45	--	--	-43.5
seroalbúmina bovina	-10	-5.3	--	-13
dextrana	-9	--	--	-13.5

En la tabla se aprecia que, para una sustancia dada, existe una gran coincidencia entre los valores de Tg' y THE, situándose también esta última entre AM e IM, ello indica que se trata de fenómenos muy relacionados. Al parecer, la causa de estas diferencias estriba en el desarrollo de métodos más precisos de detección, como la inclusión de una función análoga derivativa en algunos sistemas de CDB, ello ha permitido definir que en lugar del inicio de un pico de fusión en IM, lo que ocurra sea una transición vítrea Tg' (Levine y Slade, 1987).

La determinación de la temperatura crítica para un proceso de liofilizacion (Tg' en este caso) permite monitorear la operación de modo tal que el aspecto del producto sea el mejor pero además, asegura la estabilidad durante el almacenamiento (Franks, 1992).

En la figura 1, cualquier punto situado sobre o a la derecha de la curva G estará en estado vítreo, incluso a altas temperaturas. En este estado la movilidad molecular es casi nula, por lo que de lograrse una baja humedad residual y una temperatura de almacenamiento inferior a la Tg de la sustancia anhidra, el material liofilizado será muy estable. A la izquierda de G y por encima de Tg' el material estará en estado gomoso donde hay mayor movilidad. Esto explica por qué se observan fenómenos tales como la agregación molecular en la albúmina liofilizada almacenada (Moreira *et al.*, 1992).

Las macromoléculas y los oligosacáridos presentan temperaturas de transición vítrea superiores a las correspondientes a pequeñas moléculas como los monosacáridos (tabla 2). Por su parte, el agua juega un papel plastificante, ya que a medida que se incrementa su contenido, el valor de Tg' disminuye (figura 1).

Debido a que la función de los aditivos no es sólo conferir rigidez al retículo intersticial, sino también asegurar la estabilización química, bioquímica o biológica del material, es necesario emplear mezclas cuyas funciones se complementen.

Gran parte de las sustancias activas que hoy se liofilizan son proteínas, que necesitan mantener su estructura conformacional. Se conoce que determinadas sustancias ejercen un papel protector de las proteínas tanto en solución como liofilizadas. Timasheff (1982) explicó la estabilidad de las proteínas en solución mediante un mecanismo de exclusión preferencial que permite que la proteína se mantenga hidratada y los aditivos la rodeen sin interactuar directamente.

Carpenter y Crowe (1989), utilizando la espectrometría infrarroja, demostraron que los azúcares sustituyen el agua de hidratación para estabilizar a las proteínas liofilizadas mediante la formación de puentes de hidrógeno. Al rehidratar, se favorece el mecanismo de exclusión preferencial y la proteína mantiene su estabilidad conformacional, pero esta vez enlazada a moléculas de agua.

Diferentes compuestos como azúcares, polioles y ciertos aminoácidos han sido reportados como buenos estabilizadores de proteínas en solución (Back *et al.*, 1979; von Hippel y Wong, 1962), pero algunas enzimas como la fosfofructoquinasa sólo han podido estabilizarse en forma liofilizada mediante la adición de carbohidratos (Carpenter *et al.*, 1987). También Carpenter *et al.* (1991) señalaron el efecto sinergístico de los cationes divalentes para estabilizar otras enzimas. Por su parte, para la mejor estabilización de anticuerpos monoclonales por liofilización, Roy *et al.* (1991) utilizaron una mezcla de manitol y glicina. Hora *et al.* (1991) mostraron el efecto protector de la carnitina sobre la interleucina humana recombinante, limitando la agregación proteica al ser empleada en presencia de algún azúcar o poliol. También Hora *et al.* (1992), observaron este efecto al emplear la sacarosa como aditivo para liofilizar factor de necrosis tumoral (FNT) recombinante. Por su parte Inazu y Shima (1991) emplearon la seroalbúmina humana como estabilizante del interferón gamma recombinante y Moreira *et al.* (1987) emplearon la lactosa para estabilizar el antígeno de *Anaplasma marginale* por liofilización.

La conservación de sistemas celulares ha encontrado también en los carbohidratos una vía para mantener la estabilidad post liofilización. Crowe y Crowe (1991) utilizaron trealosa como aditivo para liofilizar liposomas. Font de Valdez *et al.* (1985) emplearon el adonitol para la protección de las bacterias ácido lácticas comprobando su eficiencia frente a otros polioles (dulcitol, manitol, inositol y sorbitol).

García Carrillo (1981) obtuvo buenos resultados al liofilizar las células de la vacuna de *Brucella abortus* con adición de inositol al 10%, así como con una mezcla de bactocasitona, sacarosa y glutamato de sodio. Recientemente en nuestro laboratorio, trabajando sobre la viabilidad de cepas liofilizadas de *V.cholerae* se demostró que la concentración que era inicialmente de 10^{11} células/mL se reducía a 10^{6} células/mL después de la liofilización, si el medio utilizado era leche descremada. Sin embargo, al añadirle peptona o casaminoácidos, la concentración celular alcanzaba entre 10^{9} y 10^{10} células/mL después de la liofilización. Esto demuestra que no basta con que en el medio estén presentes sustancias que incrementen la temperatura de hundimiento de estructura, como es el caso de la leche descremada, compuesta fundamentalmente por caseína y lactosa, sino que se requiere de verdaderas sustancias protectoras de las membranas celulares cuando liofilizamos microorganismos.

CONCLUSIONES

Los carbohidratos y sus derivados representan el grupo de sustancias cuyo efecto como aditivos ha sido más evidente, tanto desde el punto de vista estructural como por la protección que han ofrecido a biomoléculas y sistemas celulares liofilizados.

Si bien es cierto que la acción favorable de los aditivos desde el punto de vista físico (incremento de la rigidez en los espacios intersticiales y de la temperatura a la que ocurren los eventos físicos indeseables) puede ser controlada en los laboratorios, los mecanismos responsables del efecto protector son poco conocidos.

A pesar de que los excipientes amorfos son los más apropiados, su presencia no es suficiente para incrementar la estabilidad. De hecho, pueden existir interacciones entre el excipiente y la sustancia activa que la desestabilicen.

Es necesario evitar altos niveles de tampones u otras sales, para impedir su cristalización y que esto provoque cambios bruscos de pH.

Los azúcares, aunque por mecanismos diferentes, estabilizan a las proteínas tanto durante la congelación como en el secado y el almacenamiento.

El conocimiento de las características físicas de la solución estabilizante de la sustancia biológica de interés, combinado con el estudio del efecto de los procesos de congelación-sublimación-desorción son en última instancia dan un criterio real de las variantes de aditivos más adecuadas para lograr los mejores resultados. No existe una formulación universal. Ella dependerá de la especie biológica o del tipo de sustancia activa empleadas.

REFERENCIAS

ASHWOOD-SMITH, M.J. y E.L. GRANT (1976). Mutation induction in bacteria by freeze-drying. *Cryobiology* **13**:206-213.

BACK, J.F.; D. OAKENFULL y M.B. SMITH (1979) Increase thermal stability of proteins in the presence of sugar and poliols. *Biochemistry* **18**:5191-5196.

BELLOWS, R.J. y C.J. KING. (1972). Freeze-drying of aqueous solutions: maximun allowable operating temperature. *Cryobiology* **9**:559-561.

CARPENTER, J.F.; L.M. CROWE y J.H. CROWE (1987). Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: Characterization of enhanced protection in the present of divalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta* **923**:109-115.

CARPENTER, J.F. y J.H. CROWE (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**:3916-3922.

CARPENTER, J.F.; T. ARAKAWA y J.H. CROWE (1991). Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *Develop. Biol. Standard.* (Karger, Basel), **74**:225-239.

CROWE, L.M. y J.H. CROWE (1991). Stabilization of dry liposomes by carbohydrates. *Develop. Biol. Standard.*, (Kargel, Basel), **74**:285-294.

DIALLO, F. (1978). Contribution à l'étude de l'influence des caractères physico-chimiques des composés pectiques sur l'aptitude à la lyophilisation des jus de fruits. *Thèse de troisième cycle*. Université de Dijon, France.

FONT DE VALDEZ, G.; G. SAVOY DE GIORI; A. PESCE DE RUIZ HOLGADO y G. OLIVER (1985). Influence of recovery medium on the viability of injured freeze-dried lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* **40(9)**:518-520.

FRANKS, F. (1985). Complex aqueous systems at subzero temperatures. En: *Properties of water in foods*. (Ed. D. Simatos y J.L. Multon). Dordrecht. Martinus Nijhoff Pub., 497-509.

FRANKS, F. (1990). Freeze-drying: From empiricism to predictability. *Cryo-Letters* **11**:93-110.

FRANKS, F.; R.H.M. HATLEY y SHEILA F. MATHIAS (1991). Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *Biopharm* **4**:38-42.

FRANKS, F. (1992). Freeze-drying: A combination of physics, chemistry, engineering and economics. *Japanese Journal of Freezing and Drying*. **38**:5-16.

GARCIA CARRILLO, C. (1981). Supervivencia de las células de la vacuna *Brucella abortus* cepa 19 durante el proceso de liofilización, según el vehículo utilizado. *Revista Argentina de Microbiologia* **13(1)**:31-34.

HORA, M.S.; R.K. RANA; C.L. WILCOX; N.V. KATRE; P. HIRTZER; S.N. WOLFE y T.W. THOMSON (1991). Development of a lyophilized formulation of interleukin-2. *Develop. Biol. Standard.* (Kargel, Basel), **74**:295-306.

HORA, M. S.; R.K. RANA y F.W. SMITH (1992). Lyophilized Formulations of Recombinant Tumor Necrosis Factor. *Pharmaceutical Research*. **9(1)**:33-36.

INAZU, K.; K. SHIMA (1991). Freeze-drying and quality evaluation of protein drugs. *Develop. Biol. Standard.* (Kargel, Basel), **74**:307-322.

ITO, K. (1970). Freeze-Drying of pharmaceuticals. On the change in the macroscopic appearance during freezing and critical temperature necessary for freeze-drying. ***Chem. Pharm. Bull.*** (Tokyo) **18/8**:1509-1518.

KAREL, M. (1975). Heat and mass transfer in freeze- drying. En: ***Freeze-drying and advanced food technology***. S.A. Goldblith, L. Rey, W.W. Rothmayr Ed. A.P., 177-202.

KING, C.J. (1973). Applications of freeze-drying to food products. Sixth Int. Course on Freeze-drying and Advanced Food Technology. Birganstock-Lucerne, Switzerland June 19.

LEVINE, H. y L. SLADE (1987) Collapse Phenomena. A unifying concept for interpreting the behavior of low-moisture foods. En: *Food Structure. Its creation and evaluation*. Eds. J.R. Mitchell and J.M.V. Blausherd, Butterworths, London.

LEVINE, H. y L. SLADE (1988). Principles of ***cryostabilization*** technology from structure/property relationships of carbohydrate water systems. A review. *Cryo-letters* **9**:21-63.

MACKENZIE, A.P. (1966). Basic principles of freeze-drying for pharmaceuticals. *Bull. Parent. Drug. Assoc.* **20**:101-129.

MACKENZIE, A.P. (1975). Collapse during freeze-drying. Qualitative and quantitative aspects. En: *Freeze-drying and Advanced Food Technology*. S.A.Goldblith, L. Rey, W.W. Rothmayr Ed. A.P., 277-307.

MACKENZIE, A.P. (1985). A current understanding of the freeze- drying of representative aqueous solutions. En: *Fundamentals and applications of freeze-drying to biological material drugs and foodstuffs*. Com C1. I.I.R. Tokyo, 21-34.

MALTINI, E. (1974). Thermophysical properties of frozen lemon juice related to freeze-drying problems. *Annexe Bull. I.I.F.* **3**:201-208.

MALTINI, E. (1977). Studies on the physicals changes in frozen aqueous solutions by DSC and microscopic observations. I.I.R. Com C1, C2 Karlsruhe, Germany, 43-52.

MOREIRA, T.; F. SAUVAGEOT y D. SIMATOS (1974). Effet de l'addition de saccharose sur le comportement en lyophilisation d'un jus de framboise. XII Congrès International C.I.I.A., Athènes, Grece, 725-736.

MOREIRA, T. (1976). Contribution à l'étude des relations entre l'aptitude à la lyophilisation des jus de fruits et leur caractéristiques chimiques. Thèse de Docteur Ingénieur. E.N.S.B.A.N.A., Université de Dijon, France.

MOREIRA, T. y D. SIMATOS (1977). Quelques données sur les relations entre l'aptitude à la lyophilisation des jus de fruits et leur composition chimique. I.I.F. Com. C1, C2. Karlsruhe, Allemagne, 487-493.

MOREIRA,T. (1981). Estudio de las propiedades termofísicas de los cuatro componentes mayoritarios de los jugos de frutas en relación con la liofilización. *Tecnologia Quimica*, Año II, **4**:71-78.

MOREIRA, T.; J. ROMERO y M. ALONSO (1987). Etude des conditions de lyophilisation de l'antigène d'*Anaplasma marginale* en vue de son utilisation dans le *Card Test*. *Proceedings Cong. Int. du Froid*, Vienne, Autriche, 141-145.

MOREIRA, T.; L. CABRERA; A. GUTIERREZ; A. CADIZ y M.E. CASTELLANO (1992). Role of temperature, on monomer content of freeze-dried human albumin. *Acta Pharmaceutica Nordica* **4(1)**:59-60.

NEI, T. (1973). Some aspects in freezing and drying of microorganisms in the basis of cellular water. *Cryobiology* **10(5)**:403-408.

OHNISHI, T.; Y. TANAKA; M. YOH; Y. TAKEDA y T. MIWATANI (1977). Desoxyribonucleic acid strand breaks during freeze- drying and their repair in *E. coli*. *Journal of Bacteriology* **130**:1393-1396.

PIKAL, M.J. (1990). Freeze-drying of proteins. II. Formulation selection. *BioPharm* **3**:26-30.

PIKAL, M.J., S. SHAH, M.L. ROY y R. PUTMAN. (1990). The secondary drying stage of freeze-drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int. J. of*

REY, L. (1964). Aspects Théoriques et Industriels de la Lyophilisation. Ed. Hermann, Paris.

ROY, M.L.; M.J. PIKAL; E.C. RICKARD y A.M. MALONEY (1991). The effect of formulation and moisture on the stability of a freeze-dried monoclonal antibody-Vinca conjugated: a test of the WLF glass transition theory. *Develop. Biol. Standard.* (Kargel, Basel), **74**:323-340.

SIMATOS, D.; G. BLOND; Ph. DAUVOIS y F. SAUVAGEOT (1974). La Lyophilisation. Principes et Applications. Collection de l' A.N.R.T., Paris.

SIMATOS, D. y M. KAREL (1988). Characterization of the condition of water in foods, En: *Food Preservation by Moisture Control.* C.C. Seow Ed. Elsevier Appl. Sci., 1-41.

TIMASHEFF, S.N. (1982). Preferential interactions in protein-water-cosolvent system, En: *Biophysics of water.* Franks F. and S. Mathias Ed. Wiley, N.Y., 70-72.

VON HIPPEL, R.H. y K.Y. WONG (1962). The effect of ions on the kinetics of the formation and the stability of the collagen fold. *Biochemistry* **1**:664-674.

WILLEMER, H. (1991). Measurements of temperatures, ice evaporation rates and residual moisture contents in freeze- drying. *Develop. Biol. Standard,* (Kargel, Basel), **74**:123-136.