

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

**PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO
DE LIOFILIZACIÓN PARA LA
CREACIÓN DE BANCOS BACTERIANOS**

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Alin Grauer – 158697
Karin Grunberg – 174542
Sofía Zardo – 172721

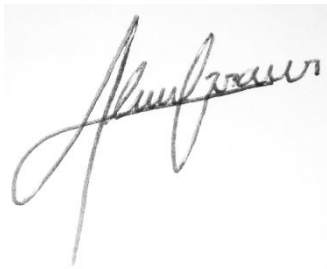
Tutor: Matilde Anido
2015

Declaración de Autoría

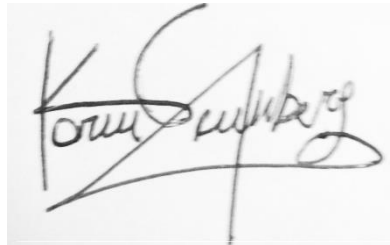
Nosotras, Alin Grauer, Karin Grunberg y Sofia Zardo, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano.

Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el trabajo final de carrera para obtención del título de Licenciatura en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Alin Grauer
13 abril 2015



Karin Grunberg
13 abril 2015



Sofía Zardo
13 abril 2015

Agradecimientos

Queremos agradecer a aquellas personas y organizaciones que nos apoyaron a lo largo de la realización de este trabajo:

A Laboratorios Microsules, por la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, por el material brindado y especialmente agradecemos a nuestra tutora MSc. Matilde Anido, por su apoyo constante y por compartir sus conocimientos con nosotras.

A la Universidad ORT Uruguay y a MSc. Carlos Sanguinetti, coordinador de la carrera, por el apoyo brindado durante la misma.

Al Lic. Eduardo Cuitiño por su tiempo, dedicación y conocimiento brindado durante el proyecto.

Por último pero no menos importante, a nuestras familias y amigos, por su apoyo constante y confianza en nosotras.

¡Muchas gracias!

Abstract

La liofilización es un método para la preservación de microorganismos a largo plazo, aspecto esencial en muchas industrias. La pureza, identidad y la estabilidad son características fundamentales a considerar en el material biológico almacenado.

Este proyecto parte de la necesidad de la empresa Laboratorios Microsules de conservar su cepario bacteriano mediante el método de liofilización.

El estudio consistió en la formulación y liofilización de tres cepas bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus anthracis*, utilizando un liofilizador a nivel de laboratorio. Leche descremada, sacarosa, leche descremada en combinación con glicerol y leche descremada en combinación con sacarosa fueron los lioprotectores probados.

Los parámetros evaluados fueron la estructura física del producto final, el efecto del paso de congelado en la liofilización, la viabilidad celular luego del proceso de liofilización y la viabilidad luego de la prueba de estabilidad acelerada (5 días a 37°C). Se observó que el uso de mezclas de lioprotectores permite alcanzar mayores porcentajes de recuperación celular en las cepas estudiadas.

Finalmente, la empresa interesada fue provista de un protocolo de liofilización para la conservación de microorganismos a largo plazo.

Palabras clave

Liofilización, conservación de microorganismos, lioprotectores, cepario.

Índice

1	Introducción.....	7
1.1	Conservación de microorganismos	7
1.2	Liofilización.....	8
1.2.1	Características generales	8
1.2.2	Formulación	11
1.2.3	Proceso de liofilización	13
2	Objetivos.....	18
2.1	Objetivo general.....	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	Metodología.....	19
3.1	Cepas microbianas	19
3.2	Liofilización.....	19
3.2.1	Crecimiento de cepas bacterianas	19
3.2.2	Preparación de lioprotectores	21
3.2.3	Procesamiento de células previo a la liofilización	21
3.2.4	Liofilización	22
3.3	Aspecto físico	22
3.4	Determinación del porcentaje de viabilidad	22
3.5	Prueba de estabilidad	23
3.6	Análisis estadístico	23
3.7	Diagrama de flujo del proceso	23
4	Resultados Obtenidos	24
4.1	Crecimiento de cepas bacterianas y Control de identidad.	24
4.2	Aspecto físico del producto, determinación del porcentaje de viabilidad y análisis estadístico.....	25
4.2.1	Aspecto físico y reconstitución de los viales.	25
4.2.2	Efecto del paso de congelado en la viabilidad celular	27
4.2.3	Recuperación de microorganismos post-liofilización.....	28
4.2.4	Prueba de estabilidad.....	33
5	Discusión	36
6	Análisis Económico.....	39
7	Conclusiones.....	40
8	Referencias Bibliográficas.....	41
9	Anexos.....	45

1 Introducción

1.1 Conservación de microorganismos

El agua es un solvente universal que apoya las actividades bioquímicas dentro de las células, siendo esta esencial para la vida. La misma permite el desarrollo de los procesos metabólicos y sustenta todos los procesos vitales. En ausencia de agua, la vida tal como la definimos acabaría, lo que resultaría en un estado de latencia e inhibición de la actividad bioquímica en las células vivas. El agua también juega un papel importante en la conservación y estabilidad de diversos productos durante el almacenamiento. Es por esto que para conservar productos lábiles se debe inmovilizar o reducir el contenido de agua, ya que la misma proporciona condiciones que potencian la autólisis, y/o promueven el crecimiento de organismos contaminantes (1).

La preservación a largo plazo de microorganismos es un aspecto muy importante cuando se trabaja en investigación o en industrias como la farmacéutica, la agrícola y la alimenticia (2, 3). Hay tres características fundamentales a tener en cuenta para establecer la calidad del material biológico almacenado: la pureza, identidad y la estabilidad (4).

Antes de que surgiesen los métodos de conservación modernos, las colecciones de cultivos sufrían diferentes complicaciones como la adaptación del organismo al ambiente *in vitro*, mutaciones genéticas, contaminación o pérdida accidental de los cultivos, en parte debido a que los cultivos se mantenían activos metabólicamente mediante subcultivos repetidos. Con el fin de evitar lo mencionado anteriormente, es que fue necesario implementar nuevos mecanismos de conservación que permitieran detener o al menos reducir la actividad metabólica, minimizando así los riesgos antes mencionados (4).

Desde hace años se utilizan bajas temperaturas para evitar la degradación de los materiales biológicos. Gracias a avances tecnológicos se lograron métodos exitosos y confiables para la preservación de organismos procariotas y eucariotas, dichos avances permitieron un almacenamiento a largo plazo donde los procesos metabólicos se encuentran suspendidos (4). Las técnicas modernas tienen como objetivo causar el mínimo daño a las células, asegurar la máxima viabilidad y lograr estabilidad genética (5). Los métodos de preservación a largo plazo comúnmente utilizados son la criopreservación: congelación a temperaturas entre -70 y -80 °C o a temperatura ultra-baja utilizando nitrógeno líquido o *freezers* eléctricos que alcancen al menos los -130°C y la liofilización (6). La Federación Internacional de Colecciones de Cultivo (WFCC) recomienda almacenar las cepas por lo menos utilizando dos métodos de conservación diferentes con el fin de minimizar la probabilidad de perder los cultivos y reducir el riesgo de cambios genéticos. Se sugiere también que al menos uno de estos métodos sea la liofilización o criopreservación en ultra frío ya que son los métodos que aseguran mayor estabilidad genética (7).

La criopreservación permite estabilizar productos biológicos, como los microorganismos (1). Es un método sencillo en el cual se mantienen las propiedades originales del material biológico y se reduce el riesgo de contaminación, siendo útil especialmente en aquellos casos en los que no se puede utilizar el método de liofilización. El almacenamiento a temperatura ultra-baja requiere utilizar *freezers* eléctricos especializados o sistemas que utilizan nitrógeno líquido (8). Este método cuenta con ciertas desventajas debido a la

necesidad de mantener la cadena de frío para que el producto conserve sus propiedades, esto incluye el alto costo de los equipos y su mantenimiento, como también del transporte de las muestras. Otra desventaja es la dependencia eléctrica en el caso de los *freezers* o la dependencia de la recarga periódica de nitrógeno líquido (1, 9).

El método de liofilización ofrece un almacenamiento seguro a largo plazo, proporciona un producto seco, activo, estable y fácilmente soluble. Sin embargo, el procesamiento de un gran número de cultivos es laborioso, requiere equipos especializados y no es aplicable a distintos microorganismos como por ejemplo, determinadas especies de *Clostridium*, cepas de *Microcycilus* y *Helicobacter pylori* (1, 9-11).

Tanto la liofilización como la criopreservación ofrecen ventajas que superan la inversión necesaria en equipos y reactivos. Estas ventajas incluyen: evitar la pérdida o contaminación de los cultivos de interés, eliminar tiempo y costos de materiales asociados con el mantenimiento de cepas bacterianas que no están en uso, prevenir cambios fenotípicos debido a la inestabilidad genética y/o presiones selectivas (8).

1.2 Liofilización

1.2.1 Características generales

A partir de mediados del siglo XIX se registró un mayor interés en el estudio de los microorganismos, esto generó la necesidad de contar con métodos de preservación eficaces. Diversas líneas de investigación se iniciaron con el fin de alcanzar esta meta, una de ellas se basó en la desecación de los microorganismos. Es así que al inicio del siglo XX Shackell, sienta las bases del liofilizador moderno. Su trabajo permitió mostrar la efectividad de la técnica para preservar material biológico y abrió el campo a nuevas investigaciones en el tema. Sin embargo no es hasta principios del 40 que la configuración de los liofilizadores modernos es alcanzada, donde se incluye la bomba de vacío y la trampa de frío (12).

La liofilización es un método eficaz utilizado durante décadas para la preservación, transporte y almacenamiento de microorganismos a largo plazo. Una vez que el producto está preparado para ser liofilizado, el procedimiento consiste principalmente en tres pasos: congelado, secado primario (sublimación), y secado secundario (desorción), obteniendo así el producto seco final con el contenido de humedad deseado. El producto liofilizado cuenta con la ventaja de que permite un manejo fácil y económico, siendo este un método elegido y recomendado por las organizaciones de colecciones de cultivo como la American Type Culture Collection (ATCC) y la National Collection of Type Cultures (NCTC) (13-18).

Esta metodología ha ganado importancia en el mundo de la investigación debido a su aplicación en la industria farmacéutica, biotecnológica, alimentaria y química. Es útil para productos termolábiles y/o inestables en soluciones acuosas durante períodos prolongados de almacenamiento (19, 20).

En el proceso de liofilización inicialmente el material es congelado, causando una separación física entre el agua y los sólidos. En una segunda etapa del proceso, el hielo es removido del producto mediante conversión directa a vapor (sublimación). Luego de

la eliminación de los cristales de hielo, lo que queda del producto es una fase de soluto concentrado que se convertirá, al final del proceso, en el material liofilizado (14).

Cuando la liofilización es exitosa, los microorganismos pueden permanecer viables por muchos años (15). Existen estudios donde aseguran que la viabilidad de cultivos bacterianos liofilizados se mantiene durante 50 años o más (21). Sin embargo, las tasas de supervivencia después de la liofilización y durante el almacenamiento dependen del género y la especie bacteriana, los parámetros de liofilización, el medio de liofilización, el estado fisiológico de las células, las condiciones de rehidratación, entre otros (22, 23). Bajo las mismas condiciones, cepas distintas de la misma especie pueden diferir en su comportamiento durante el proceso y el almacenamiento en estado seco. Carvalho *et al.* (2004) han propuesto algunas hipótesis en cuanto a esta variabilidad entre cepas de *Lactococcus lactis*, por ejemplo: diferencias en la constitución genética pueden dar lugar a un fenotipo distinto y, diferencias en la composición de la pared celular y de la membrana, como por ejemplo fosfolípidos con puntos de fusión distinto, puede causar diferencias entre las cepas (24). Debido a la cantidad de daños potenciales y a la falta de comprensión de los mecanismos de los mismos es difícil predecir la tolerancia a la liofilización entre diferentes especies y cepas a liofilizar (25). A su vez, se obtienen resultados distintos utilizando bacterias gram negativas o gram positivas. Las bacterias gram negativas muestran generalmente menor supervivencia que las bacterias gram positivas (26).

La liofilización permite evitar el calentamiento excesivo de la muestra, proporcionar estabilidad, minimizar la descomposición química, evitar la contaminación durante el almacenamiento, mantener la viabilidad a largo plazo y facilitar la distribución del producto (20, 24, 27). Sin embargo es un proceso que cuenta con ciertas desventajas tales como: requerir largos tiempos de procesamiento y manipulación, eliminar compuestos volátiles a causa del uso de vacío y la necesidad de utilizar diluyentes estériles en el paso de reconstitución (20).

Existen tres categorías de liofilizadores: *manifold*, *rotary* y *tray style*. Este último es el que interesa a efectos de este trabajo y cuenta principalmente con los siguientes componentes (20) (Figura 1):

- Bomba de vacío, permite reducir la presión del ambiente de la cámara que contiene el material a secar. Para remover el solvente en un tiempo razonable, se debe aplicar vacío durante la etapa sublimación y desorción. El nivel de vacío requerido debe ser entre 50 y 100 μ bar.
- Cámara de secado, posee una temperatura controlada y contiene estantes donde es colocado el producto a ser procesado. La misma cuenta generalmente con un sistema de sellado de viales y está asociada a la bomba de vacío, al sistema de refrigeración y al condensado.
- Estantes, además de dar soporte en ciertos casos pueden actuar como intercambiadores de calor, removiendo la energía desde el producto durante el congelamiento, y proporcionando energía al producto durante la sublimación y desorción.
- Condensador, está diseñado para atrapar el solvente, generalmente agua, durante el proceso de secado. El mismo logra alcanzar temperaturas entre -50°C y -80°C .

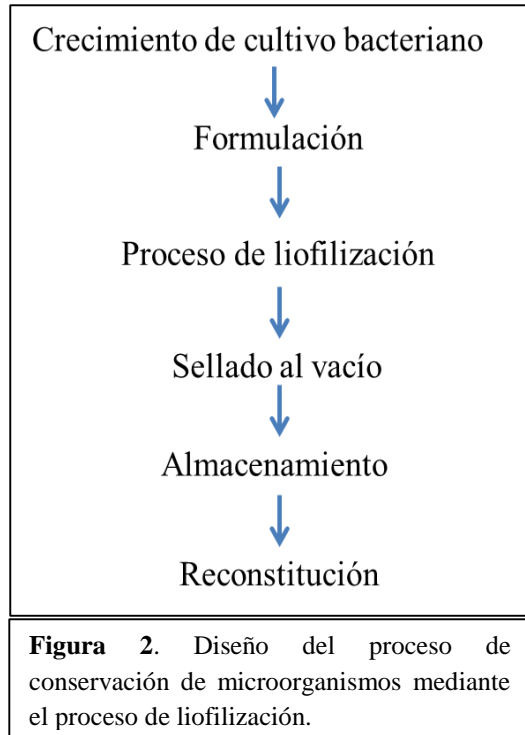


Figura 1. A la izquierda se observa el equipo liofilizador y sus componentes (28). A. Cámara de secado, B. Estantes, C. Condensador, D. Bomba de vacío. A la derecha se observa el liofilizador de Laboratorios Microsules.

Los productos a liofilizar se colocan generalmente en recipientes como viales de vidrio y los mismos son colocados en los estantes dentro de la cámara de secado. Una vez que el producto es congelado, se enciende la bomba de vacío y comienza una transferencia de calor hacia el producto. El recipiente utilizado para liofilizar una muestra debe permitir la conductividad térmica, ser capaz de ser cerrado herméticamente en el final del ciclo de liofilización, y minimizar la cantidad de humedad que puede permear las paredes del vial y la tapa (20).

El volumen utilizado para llenar los viales puede tener efectos en la apariencia y viabilidad del producto al finalizar el proceso. Si se utiliza un volumen de muestra demasiado grande en comparación con el tamaño del vial, la transferencia de calor al producto durante la sublimación y la transferencia de vapor de agua desde el producto hasta el condensador se dan de forma más lenta que si se utilizara un volumen más pequeño (17).

La liofilización es un proceso de múltiples etapas que implica el cultivo de microorganismos, suspensión de los mismos en un medio de liofilización, congelado de las muestras, liofilizado y adecuado almacenamiento (29). En la figura 2 se puede ver un esquema general del proceso de liofilización.



1.2.2 Formulación

Una de las consideraciones más importantes a la hora de liofilizar es la formulación, ya que la misma sin un adecuado procedimiento de formulación da como resultado tasas de supervivencia muy bajas. La formulación es necesaria para optimizar la eficiencia de la liofilización, la estabilidad, la seguridad y la fácil aplicación del producto y se define como la combinación de las células con los ingredientes necesarios para formar una preparación adecuada y así obtener un producto seco con las características deseadas (25, 27).

Debido a que las células sufren el estrés causado por la congelación y por el secado, la esencia de la formulación debe ser minimizar el daño durante la liofilización, la pérdida de viabilidad y/o de actividad debido a condiciones ambientales hostiles como la cristalización del hielo, la alta presión osmótica y la desecación debido a la temperatura y a la oxidación (1, 13, 16, 18, 25). Estos daños afectan varios sitios de la célula, como la permeabilidad de la pared y la membrana y la desnaturalización de macromoléculas como ADN y proteínas sensibles (16, 22, 24). La estabilización de la membrana y de sus proteínas integrales es clave ya que las membranas celulares están involucradas en el transporte de solutos, la unión célula-célula y otras funciones esenciales (30).

Se debe seleccionar cuidadosamente la técnica utilizada para cultivar y purificar las células ya que los daños ocurridos en estas etapas no serán revertidos durante la liofilización (1, 13).

Comúnmente las células se cultivan en un medio líquido, se centrifugan y luego se resuspenden en un medio adecuado para la liofilización, lioprotector. Otra opción es el crecimiento de las células en agar, ya sea en placas como en tubos inclinados, en este caso el crecimiento se lava con el medio lioprotector. La ventaja de esta última es que se evita

el paso de centrifugación, sin embargo, el uso de un cultivo líquido permite alcanzar mayor número de células (29).

Para lograr una buena liofilización las células deben encontrarse en crecimiento activo. En general, la edad de un cultivo puede afectar su capacidad de sobrevivir a la liofilización. Los cultivos bacterianos que se cosechan en la fase logarítmica tardía o fase estacionaria temprana tienen mayor probabilidad de supervivencia (8). Lo recomendado es trabajar con cultivos de altas densidades celulares, entre 10^7 y 10^9 células por ml, ya que muchas cepas pueden tener una significativa caída en la viabilidad como resultado de la liofilización, viéndose la mayor pérdida de viabilidad en el almacenamiento a largo plazo (17, 29). Una supervivencia de 0,1% de la población inicial luego de la liofilización es considerada un valor suficiente para iniciar un cultivo con las mismas condiciones que el cultivo original (31).

En cuanto al medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los microorganismos, distintas condiciones de pH, fuentes de carbono, sales, entre otras, pueden significar cambios en la viabilidad del producto seco final (17). Se ha visto que diferencias en la composición del medio de cultivo pueden influenciar en la composición lipídica de la membrana afectando así la viabilidad celular, se sostiene que influencia puede deberse a que la membrana juega un rol importante en la protección contra la liofilización (24). Existen evidencias que cambios en el pH durante la etapa de cultivo de *Lactobacillus reuteri* conlleva a cambios morfológicos en las células y desencadena un posible mecanismo de respuesta al estrés que hace a la bacteria más tolerante a la liofilización (17).

Luego del crecimiento del cultivo, se debe resuspender las células en un medio adecuado para la liofilización, denominado lioprotector. Este medio puede no ser efectivo en todas las etapas del proceso, existiendo pasos en los cuales pueda fallar en proteger la muestra. Por este motivo, para mejorar el rendimiento es conveniente utilizar más de un protector con el fin de obtener mejores rendimientos en el proceso de liofilización (1, 13, 16).

En la liofilización de bacterias no se utiliza como medio protector agua o compuestos salinos ya que las células no sobreviven a dicho proceso (21). La solución lioprotectora ideal deberá mantener la viabilidad evitando la desnaturalización de proteínas y protegiendo bioquímicamente las células vivas contra el daño durante la liofilización. La capacidad de los diferentes protectores para prevenir la desnaturalización de las proteínas puede deberse a la capacidad de formar puentes de hidrógeno con las proteínas celulares cuando el agua es removida. A su vez, deberá actuar como material de soporte y como receptor en la rehidratación del producto liofilizado. El resultado de la liofilización es una estructura física definida, también llamada torta (15, 18, 27, 29). El tipo de protector depende en gran medida del microorganismo; sin embargo, hay algunos que dan resultado en muchas especies. Dentro de estos compuestos se encuentra: la leche descremada, suero, glicerol, manitol, sorbitol, trehalosa, sacarosa, maltosa, lactosa, fructosa, glucosa, dextrano, polietilenglicol, betaína, adonitol y aminoácidos (17, 22).

Un lioprotector ampliamente utilizado es la leche en polvo descremada debido a que previene el daño celular estabilizando componentes de la membrana, proporcionando una capa protectora a las células gracias a su contenido de proteínas y creando poros en la estructura del producto liofilizado, lo que resulta en una rehidratación más sencilla (24). A su vez cuenta con la ventaja de ser un lioprotector económico y de fácil obtención. La

leche descremada en concentraciones entre 1-10% es utilizada de forma frecuente en la liofilización de diferentes microorganismos, y particularmente se ha observado que al 10% es un lioprotector adecuado para la mayoría de los microorganismos (6, 32).

Suplementar la leche en polvo descremada con agentes protectores adicionales puede potenciar el efecto protector intrínseco durante el almacenamiento. La gran diversidad de agentes protectores, se pueden clasificar de acuerdo a su forma de permear a las células, influyendo así en su modo de actuar. Existen compuestos permeables, semi-permeables y no permeables (24). Los compuestos permeables, como el glicerol, penetran tanto la pared celular como la membrana citoplasmática, estos hacen más plástica la membrana celular, suprimen la deshidratación excesiva, reducen la toxicidad por sal y previenen la formación de cristales de hielo dentro de la célula durante el congelado. Por otro lado, los compuestos semi-permeables, como la sacarosa, penetran la pared celular pero no la membrana citoplasmática, de forma tal que inducen plasmólisis en las células previo al congelado y se concentran, generando una capa que previene el crecimiento del hielo dándole protección mecánica a la membrana. En cuanto a los compuestos no permeables, como proteínas, se absorben en la superficie de los microorganismos formando una capa viscosa. Esto inhibe el crecimiento de cristales del hielo ya que aumenta la viscosidad de la solución y mantiene la estructura del hielo amorfo en la proximidad de la célula. Igualmente, la permeabilidad de los solutos depende del tipo celular y de la temperatura (24, 32).

El glicerol permite preservar la viabilidad durante la liofilización y el almacenamiento a bajas temperaturas (33). Cuando es utilizado para liofilizar microorganismos se producen cambios: disminuye la concentración de solutos y el consumo de sales por parte de las células y se equilibran las presiones osmóticas reduciendo así la deshidratación (16). Se ha reportado en cepas de *E.coli* que el glicerol reduce el daño tanto en la pared celular como en la membrana citoplasmática (32). Lijin Huang *et al.* (2006) indican que las células liofilizadas en presencia de glicerol pueden lograr una alta viabilidad, y también que la interacción entre la leche descremada y el glicerol da resultados positivos (22).

La sacarosa es utilizada en diferentes concentraciones para preservar *E.coli* (32). El efecto protector de los disacáridos puede deberse a su capacidad para hidratar y estabilizar estructuras biológicas, como las proteínas y las membranas, preservando sus funciones (17, 22, 34). Tanto los compuestos permeables, glicerol, como los no permeables, sacarosa, protegen la superficie de lipopolisacáridos de las células de *E.coli* contra los daños causados al congelar (32).

1.2.3 Proceso de liofilización

El proceso de liofilización se puede dividir principalmente en tres etapas: congelado, secado primario y secado secundario.

A la hora de liofilizar se deben de considerar distintos aspectos, entre ellos, inconvenientes como la dispersión de bacterias al abrir las ampollas o por errores en la manipulación como la rotura de las mismas y problemas de contaminación debido a la falta de técnicas asépticas. La técnica aséptica incluye la descontaminación previa de los equipos y viales y trabajar en cabina de seguridad biológica en caso de ser necesario. A su vez es importante el uso de ropa protectora para evitar cualquier tipo de contaminación (8).

Congelado

El congelado es considerado como el primer paso del proceso de liofilización y el desempeño de la misma depende significativamente de esta etapa. Las características de la matriz congelada afectan en gran medida la velocidad de secado en las etapas primarias y secundarias (8). El congelado permite la inmovilización de los componentes en solución, reduce la desnaturalización del producto por calor en el secado y a la hora de aplicar el vacío previene la ebullición evitando así la formación de espuma. Para facilitar el paso siguiente, el secado, es importante que se forme una estructura cristalina de hielo en la muestra. La formación de esta estructura también establece el comportamiento durante la liofilización y la morfología final de la muestra seca (1). La microestructura establecida durante el congelado generalmente define la microestructura del producto seco (20).

El congelado ideal es aquel en el cual el efecto de concentración de solutos es mínimo evitando así el estrés osmótico y en que los componentes de la muestra están organizados espacialmente como en la suspensión original. Sin embargo, esto normalmente es difícil de alcanzar. Por lo cual es necesario considerar las características y propiedades del solvente y del soluto en la etapa de formulación (1, 25).

Un factor crítico en el proceso de liofilización es la velocidad de congelado de las células ya que de esto depende la formación de pequeños poros o canales para que luego, durante la sublimación permita el pasaje de agua desde el interior de la muestra. Un enfriado muy rápido, si bien permite una mayor preservación de la viabilidad celular, da como resultado la formación de pequeños y numerosos cristales, lo cual minimiza la formación de canales implicando mayores tiempos de secado. Por otro lado, una congelación lenta resulta en cristales grandes y menos numerosos formándose canales menos restrictivos en la matriz durante el proceso de secado. La forma, el tamaño y la distribución de los poros en la torta seca formada luego de la etapa de secado primario dependen del tamaño de cristales de hielo formados durante la etapa de congelación (13, 19, 20, 27).

Existen diferentes opciones de congelado, ya sea utilizando el liofilizador a través de los estantes refrigerados o congelando el producto antes de cargarlo al liofilizador. Se puede congelar en un congelador a -12°C , -20°C o -80°C , someterlo a una congelación progresiva -4°C , -12°C y -20°C o utilizando nitrógeno líquido (17, 26, 27). Según el trabajo realizado por Ming *et al.* (2009) en *Lactobacillus salivarius* la condición de congelado más apropiada es congelar a -80°C durante 5 horas (35). Utilizar un *freezer* cuenta con la ventaja de que se logre una congelación lo suficientemente lenta como para alcanzar la estructura deseada de la muestra (13). Sin embargo, presenta como desventaja el aumento del riesgo de que se dé la fusión o la contaminación de la muestra por la transferencia de las mismas al liofilizador (1).

Secado primario

El secado primario, sublimación, es el paso en el cual se eleva la temperatura de la muestra congelada y se da la migración del agua desde la misma (1, 29).

Bajo condiciones atmosféricas, al calentar el agua en estado líquido se convierte en vapor, proceso conocido como evaporación. Sin embargo existe un punto, el punto triple (aproximadamente $0,00603\text{ atm}$ a 0°C) (Figura 3), en el cual los tres estados del agua

coexisten: hielo, líquido y vapor. Por lo tanto, a presiones subatmosféricas el hielo puede convertirse directamente en vapor mediante sublimación (1, 20).

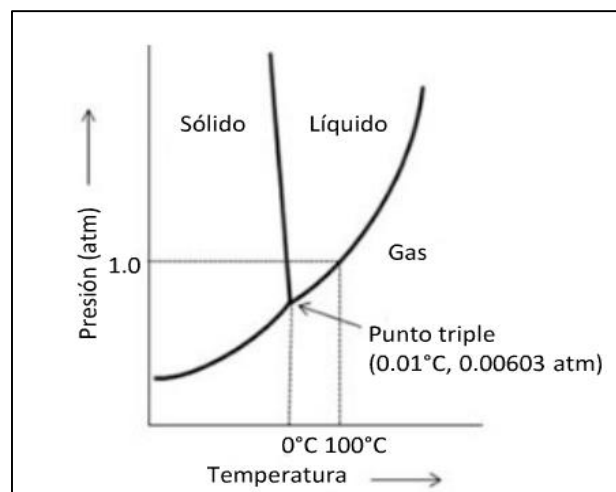


Figura 3. Diagrama de fase mostrando el punto triple del agua. Editado a partir de Nireesha et al. (2013) (20).

El gradiente de concentración de vapor de agua entre el producto a ser secado y el condensador es la fuerza motriz que impulsa la eliminación del agua durante la liofilización. La presión de vapor de agua aumenta con un aumento en la temperatura durante el secado primario (20). Para que se produzca la sublimación se debe suministrar energía, la temperatura en este paso debe mantenerse tan alta como sea posible para que el proceso sea eficaz, pero por debajo de la temperatura de fusión o de colapso, para evitar la fusión y por lo tanto, la pérdida de la estructura de la torta (1, 19, 20). Para que la liofilización sea exitosa se aplica vacío con el fin de reducir la presión por debajo de los 200 mtorr (29). De esta manera, la presión de la cámara de secado se encuentra por debajo de la presión de vapor lo que asegura la migración de este desde el producto hacia el condensador, el cual debe estar a una temperatura menor (29, 36).

A diferencia de la evaporación, la sublimación al vacío minimiza los efectos de concentración de producto lo cual garantiza un producto poroso, seco, activo y fácilmente soluble (1). Es extremadamente importante que la temperatura a la que un producto es liofilizado mantenga la integridad del producto congelado y sea una temperatura que maximice la presión de vapor del producto. Este equilibrio es la clave para un secado óptimo (20).

Secado secundario

Durante el segundo secado o “desorción isotérmica” la humedad residente ligada es removida para lograr una estructura seca. El agua restante durante el secado secundario se encuentra unida más fuertemente, lo que requiere más energía para su eliminación (1, 20).

El secado secundario se inicia por el aumento de la temperatura manteniendo una baja presión para reducir el contenido de agua residual hasta un nivel deseado (19, 20). El

mismo representa entre el 30-40% del tiempo total del proceso pero se remueve únicamente entre el 5-10% de la humedad total de la muestra. Al ser removida la humedad residual, la muestra alcanza un estado estable. La desorción es favorecida por el aumento de la temperatura bajo condiciones de vacío. Se debe mantener la temperatura por debajo de la temperatura de colapso y de esta forma evitar la pérdida de la estructura de la muestra (1, 20). La cantidad de agua residente luego del secado afecta la tasa de pérdida de viabilidad durante el almacenamiento (37).

En la figura 4 se muestran las tres etapas del proceso de liofilización en función de la variación de temperatura a lo largo del proceso (25).

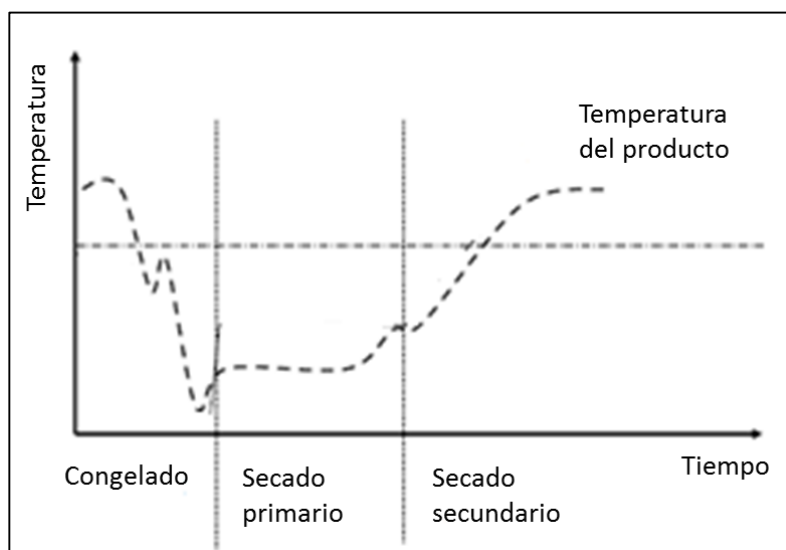


Figura 4. Ilustración del ciclo de liofilización dividido en tres etapas: congelado, secado primario y secado secundario. La línea punteada corresponde a la temperatura del producto. Editado a partir de Schoug (2009) (25).

Sellado

Tras el secado secundario, los viales deben ser sellados al vacío para evitar la entrada de reactivos, gases atmosféricos y aire húmedo que puedan desestabilizar o contaminar el producto (1, 13).

Almacenamiento

Una de las principales razones de liofilizar es mejorar la estabilidad a largo plazo de un producto durante el almacenamiento. Sin embargo, un correcto proceso de liofilización no asegura una larga vida útil en condiciones ambientales (25).

Estudios previos aseguran que la temperatura es un parámetro crítico para la supervivencia microbiana durante el almacenamiento. La estabilidad del producto decrece durante el almacenamiento, y se alcanza mayor supervivencia cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento. A su vez, la pérdida de viabilidad puede deberse a la cantidad de agua presente en el producto liofilizado luego del secado. Por lo tanto, los factores que hay que tener en cuenta para lograr un ambiente controlado son: temperatura, procesos oxidativos, exposición a la luz y humedad relativa (24, 37).

Un factor que afecta la estabilidad del producto es la actividad de agua en la muestra seca, esto depende tanto del agente lioprotector utilizado como de los parámetros del proceso. Cuanto mayor sea el valor de actividad de agua luego de la liofilización menor será la viabilidad durante el almacenamiento, ya que los solutos pueden difundir en agua y dañar la célula por un efecto osmótico (18).

Mantener altas tasas de supervivencia durante el almacenamiento de los productos liofilizados en condiciones ambientales es difícil, por este motivo, se recomienda almacenar las células bacterianas liofilizadas a temperaturas bajas, cercanas a los 4°C, en ausencia de luz (21).

Estudios de estabilidad natural son requeridos para evaluar la viabilidad del producto almacenado luego de un período prolongado de tiempo. Muchas veces se realizan pruebas de estabilidad aceleradas con el fin de reducir tiempos y así poder estimar la estabilidad del producto, por ejemplo incubar 37°C durante una semana simula un año en el tiempo (38). Para evaluar la estabilidad del producto bacteriano liofilizado luego de transcurrido un largo periodo de tiempo, Mputu Kanyinda *et al.* (2012) realizan una prueba de estabilidad acelerada en *Pseudomonas fluorescens* que consiste en colocar los viales a 37°C durante 28 días de exposición y toman muestras en intervalos de 7 días. (39). Portner *et al.* (2007) realizan un test de estabilidad acelerada en *Campylobacter jejuni* utilizando diferentes temperaturas incluyendo 37 °C (15).

Reconstitución

El proceso involucra la adición de una cantidad conocida de diluyente a la torta seca. La torta ideal es aquella que al adicionar el diluyente resulta en una disolución rápida, no más de un minuto, y completa de la misma (12).

La recuperación de células viables se ve afectada por diferentes condiciones como el volumen de rehidratación, la temperatura, el pH y osmolaridad del tipo de solución utilizado. Al utilizar soluciones diluidas para la rehidratación, el shock osmótico puede causar estrés en la membrana citoplasmática, por este motivo lo recomendado es utilizar medios de cultivos nutritivos no selectivos los cuales permiten maximizar la recuperación. Se sugiere utilizar para la rehidratación un volumen de medio igual al utilizado previo a la liofilización (8, 15, 17, 25).

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Poner a punto un protocolo de liofilización que permita conservar diversas cepas bacterianas con el fin de conservar los bancos maestros y de trabajo del cepario de producción de la empresa Laboratorios Microsules.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar distintos medios lioprotectores para la liofilización de tres cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus anthracis*.
- Evaluar el efecto de diferentes tiempos de liofilización.
- Evaluar el efecto del paso del congelado.
- Evaluar la estabilidad de los productos liofilizados.

3 Metodología

El trabajo práctico se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de la planta de biológicos de Laboratorios Microsules. Los materiales, las cepas y los equipos utilizados fueron provistos por la empresa. En todas las etapas del proceso se trabajó siguiendo buenas prácticas de manufactura (BMP/GMP).

3.1 Cepas microbianas

De la colección de microorganismos del Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios Microsules se utilizaron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC® 8739™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™) y *Bacillus anthracis* (LANAGRO cepa Sterne 34F2) (cepa no patógena).

3.2 Liofilización

3.2.1 Crecimiento de cepas bacterianas

3.2.1.1 Cultivo bacteriano

A partir de una ampolla congelada a -80°C del banco de trabajo de *Escherichia coli* (ATCC® 8739™) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™) previamente realizado por el personal de Laboratorios Microsules se inoculó un matraz con 200mL de Nutrient broth (NB) CM0001B (OXOID®, UK) preparado según las indicaciones del fabricante y esterilizado a 121°C durante 15 minutos y se incubó a 37°C durante 24 horas.

A partir de una ampolla conservada a 4°C del banco de trabajo de *Bacillus anthracis* (LANAGRO cepa Sterne 34F2), previamente realizado por el personal de Laboratorios Microsules, se inoculó un tubo de agar inclinado de Agar Anthrax (5,0 g K_2HPO_4 , 1,0 g KH_2PO_4 , 0,5 mL Solución de CaCl_2 al 20% g/L, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5,0 g Triptona, 50 g Extracto de levadura, 22 g Agar, Agua para inyección c.s.p. 1L) en tubo inclinado y se incubó a 37°C durante 48 horas.

La manipulación de microorganismos se realizó, en todos los casos bajo flujo laminar, se monitoreó las condiciones de asepsia utilizando como controles de cabina 2 placas de TSA (Tryptone Soya Agar, CM0131B; OXOID® preparado según instrucciones del fabricante) las cuales se incubaron a 37° durante 24 horas.

3.2.1.2 Control de identidad y pureza

Observación macroscópica

Ampollas congeladas a -80°C del banco de trabajo de *E.coli*, *P.aeruginosa* y *B.anthraxis* se sembraron por el método de estría en placa de Tryptone Soya Agar (TSA) CM0131B (OXOID®, UK) para comprobar pureza e identidad de las mismas. Se incubó a 37°C durante 24 horas y se observó pureza y apariencia.

En el caso de *E.coli* se esperan colonias circulares, de margen entero, con elevación, de tamaño pequeño y puntiforme, textura lisa, apariencia brillante, sin pigmentos y transluciente. En el caso de *P.aeruginosa* se espera colonias redondeadas y aplanadas de

color apenas verdoso. Y, en el caso de *B.anthraxis* se esperan colonias de 2 a 3 mm de diámetro, sobreelevadas, blanco-grisáceas, opacas y de borde irregulares.

Tinción de gram

Se realizó una tinción de gram para corroborar identidad y poder distinguir entre bacterias gram positivas y gram negativas, el principio de esta técnica se basa en las diferencias que existen entre las paredes celulares de estas. Las bacterias gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano mientras que las gram negativas poseen una capas más fina. Aquellas que poseen una capa más gruesa de peptidoglicano retienen el complejo cristal violeta/lugol dando como resultado un color violeta y se las denomina gram positivas. Por otro lado, aquellas que poseen una capa fina de peptidoglicano no son capaces de retener el complejo y por lo tanto se pierde la coloración violeta denominándolas gram negativas. *E.coli* y *P.aeruginosa* se observan como bacilos gram negativos, mientras *B.anthraxis* se observa como bacilos gram positivos con esporas centrales.

Procedimiento:

1. Fijar la muestra en un portaobjetos mediante aplicación de calor
2. Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto
3. Lavar con agua corriente
4. Colocar lugol durante 1 minuto
5. Lavar con agua corriente
6. Cubrir con etanol 95% 30 segundos
7. Lavar con etanol
8. Lavar con agua corriente
9. Teñir con safranina durante 10 segundos.
10. Lavar y secar
11. Observar al microscopio

Crecimiento selectivo y diferencial

Con el fin de corroborar identidad de las cepas, las mismas se sembraron en medio selectivo y/o diferencial. Se sembró en placa de Pseudomonas cetrimide agar USP CM0579B(AC) (OXOID®, UK) y MacConkey agar (MCC) CM0007B (OXOID®, UK) mediante método de estría. Por otro lado, se sembró en tubo Triple Sugar Iron Agar (TSI) CM0277B (OXOID®, UK) mediante de método de punción y estría. Se incubó a 37°C durante 24 horas. Se corroboró presencia o ausencia de crecimiento.

El crecimiento de *E.coli* en MCC se observa como colonias rojas, con consistencia no mucosa. Esto se debe a que el medio contiene lactosa y *E.coli* puede fermentarla causando así una disminución del pH en el medio apareciendo colonias de color rojo. El crecimiento de *P.aeruginosa* en AC se observa como colonias amarillo verdosas o marrones amarillentas. Esto se debe a que el medio permite el crecimiento selectivo de *P.aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos ya que en su formulación contiene cloruro de *magnesio* y sulfato de potasio los cuales promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína.

En el caso de del TSI, para *E.coli* se espera, fondo ácido, superficie acida, formación de gas positivo y H₂S negativo ya que fermenta glucosa, sacarosa y lactosa, no produce ácido

sulfhídrico pero si produce gas. En el caso de *P.aeruginosa* se espera, fondo alcalino, superficie alcalina, formación de gas negativo y H₂S negativo ya que *P.aeruginosa* no fermenta glucosa, sacarosa ni lactosa, no forma gas ni ácido sulfhídrico.

3.2.2 Preparación de lioprotectores

Los lioprotectores utilizados fueron leche, sacarosa y glicerol y mezclas de los mismos:

- Leche descremada reconstituida al 10% (L10).
- Leche descremada reconstituida al 20% (L20).
- Leche descremada reconstituida al 10% + Glicerol al 1% (L10G1).
- Leche descremada reconstituida al 20% + Glicerol al 1% (L20G1).
- Leche descremada reconstituida al 10% + Glicerol al 10% (L10G10).
- Sacarosa al 10% (S10).
- Leche descremada reconstituida al 10% + Sacarosa al 10% (L10S10).

3.2.3 Procesamiento de células previo a la liofilización.

Para el caso de los cultivos de *P.aeruginosa* y *E.coli*, se centrifugó 200mL del cultivo utilizando la centrifuga Thermo SL40 a 20°C durante 30 minutos a 4000g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 20 mL del medio lioprotector (Tabla 1). Mientras que para el caso del cultivo de *B.anthraxis*, se cosecharon las células agregándole al tubo de agar inclinado 20mL del medio lioprotector. Para *B.anthraxis* se ensayaron solo dos de los lioprotectores preparados debido a resultados preliminares (Tabla 1).

Se colocaron 2 mL de la preparación en viales de vidrio, lavados y esterilizados previamente a 121°C, durante 15 minutos. Los mismos fueron tapados parcialmente con tapones de butilo con muesca previamente esterilizados a 121°C, durante 15 minutos. Y por último, se colocaron los viales en el freezer Thermo modelo 906, a -80°C durante 24 horas.

Tabla 1. Lioprotectores utilizados para cada cepa.

Cepa	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.anthraxis</i>
L10	✓	✓	
L20	✓	✓	
L10G1	✓	✓	✓
L10G10		✓	
L20G1	✓	✓	✓
S10	✓	✓	
L10S10	✓	✓	

3.2.4 Liofilización

Se trabajó con el liofilizador VirTis BenchTop K configurado en modo “AUTO”. Se colocó la bandeja del liofilizador en *freezer* a -20°C . Se encendió el liofilizador y se comenzó el enfriado del condensador hasta alcanzar los -60°C . Los viales congelados fueron retirados del *freezer* a -80°C y se colocaron en la bandeja del equipo. Se encendió la bomba de vacío y se comenzó el proceso. A las 24 horas se frenó la liofilización y se cerraron los viales al vacío utilizando la manija del equipo. Se retiraron los viales y se precintaron utilizando el sellador. Finalmente se inspeccionó el aspecto físico del producto seco y se almacenaron los viales a 4°C .

3.3 Aspecto físico

Un parámetro que se evaluó en este trabajo fue el aspecto físico de los productos secos finales como parámetro indicativo de una correcta liofilización. Para realizar este análisis se observó color, brillo, estructura (torta) y encogimiento del producto seco final y la presencia o no de material residual adherido a las paredes del vial. El encogimiento se refiere a la diferencia entre altura de llenado y la altura del producto final. Los productos secos finales que no contaban con una estructura física definida se descartaron.

3.4 Determinación del porcentaje de viabilidad

Se determinó el número de células previo al congelado, luego de la liofilización y luego de la prueba de estabilidad acelerada como unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL). En el caso de *E.coli* L10, *P.aeruginosa* L10 y *B.anthraxis* L10G1 se realizó luego del congelado. En el caso de las muestras ya liofilizadas previo a la determinación de las ufc, se reconstituyó colocando 2 mL de medio de cultivo NB y se dejó hidratar un minuto y luego se resuspendió lentamente hasta lograr una mezcla homogénea.

Procedimiento:

Se colocó 100 μL de la muestra en 900 μL de suero fisiológico (NaCl 0,9% en agua destilada) esterilizado a 121°C durante 15 minutos (dilución 10^{-1}). Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-9} en suero fisiológico y se sembraron 100 μL de cada una de las muestras en placa de TSA. Se incubó a 37°C durante 16hs. Se seleccionaron las placas que presentaban entre 30-300 colonias y se calculó las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL):

$$\text{ufc/mL} = \text{n}^{\circ} \text{ de colonias en placa} \times \frac{1}{\text{dilución}} \times \frac{1}{\text{volumen de sembrado (mL)}}$$

Luego, a partir de las ufc/mL se calculó la viabilidad, utilizando la ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\frac{\text{ufc}}{\text{mL}}_{\text{final}}}{\frac{\text{ufc}}{\text{mL}}_{\text{inicial}}} \times 100$$

3.5 Prueba de estabilidad

Colocar dos viales de cada lote liofilizados y sellados en la estufa a 37°C durante 5 días.

3.6 Análisis estadístico

En primer lugar se analizó si los datos de los recuentos celulares cumplían con los supuestos para aplicar estadística paramétrica, para ello se analizó si los datos seguían una distribución normal a través del test de Kolmogórov-Smirnov utilizando la corrección de Lilliefors. Por otro lado, se analizó la homogeneidad de varianza mediante el test de Levene. En los casos en que no se cumplían con los supuestos paramétricos, se aplicó una transformación de los datos $\log(\text{ufc/mL})$ y se repitieron los estudios de normalidad y homogeneidad de varianza. En los casos que los datos cumplieron los supuestos paramétricos se utilizó el test de ANOVA, cuando los datos fueron no paramétricos se utilizó el test de Kruskal Wallis, con posterior análisis pareado con el test de Mann Whitney.

En todos los casos se estableció que los valores de p menores a 0,05 eran significativos. Los análisis de normalidad y los diagramas de cajas se realizaron utilizando el *software* Gnumeric 1.10.9. Los demás test estadísticos se realizaron utilizando *software* PAST versión 2.15 (40).

3.7 Diagrama de flujo del proceso

Se elaboró un diagrama de flujo del proceso incluyendo sus puntos críticos. Ver Anexo 1.

4 Resultados Obtenidos

4.1 Crecimiento de cepas bacterianas y Control de identidad.

Se constató la pureza de las cepas cultivadas, en todos los casos se observó un solo tipo de morfología a nivel de colonia el cual coincidió con el esperado ya que en el caso de *E.coli* se observaron colonias circulares con elevación, de tamaño pequeño, textura lisa, y translucente; en el caso de *P.aeruginosa* se observaron colonias redondeadas y aplanadas de color apenas verdoso, y en el caso de *B.anthraxis* se esperan colonias blanco-grisáceas, opacas y de borde irregulares (Figura 5).

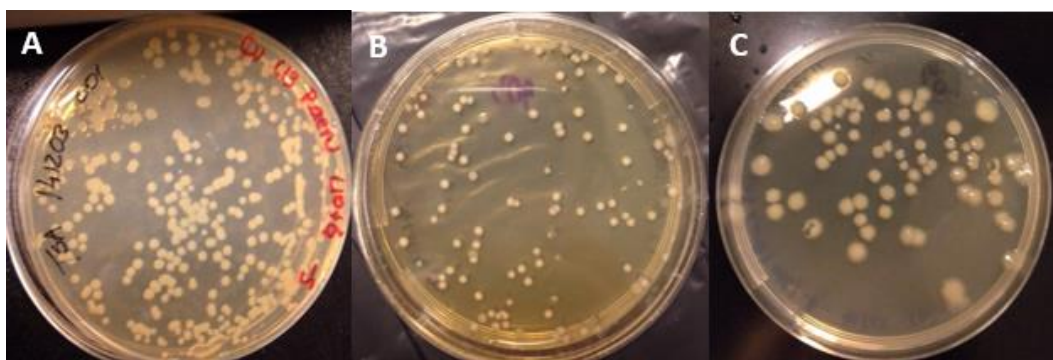


Figura 5. Colonias obtenidas mediante la técnica de recuento en placa de TSA. A. *P.aeruginosa*, B. *B.anthraxis*, C. *E.coli*

La observación al microscopio de las células a las que se les realizó la tinción de gram, mostraron también que las colonias estaban puras y que la morfología coincidía con la esperada (Figura 6).

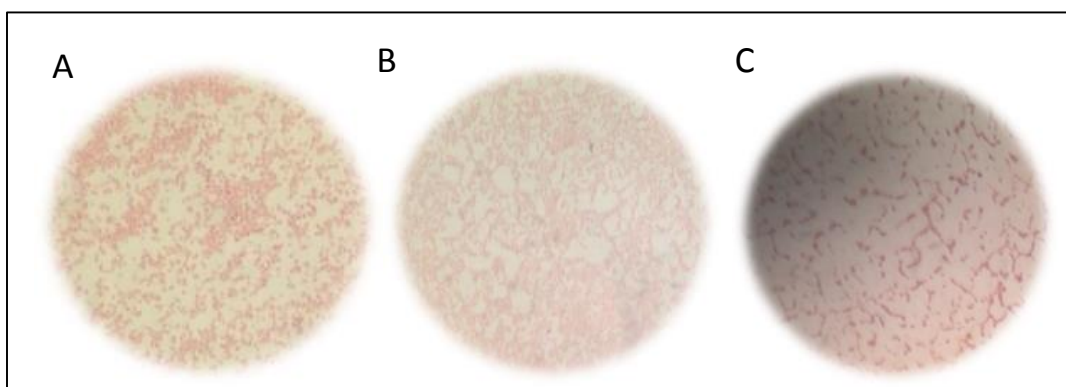


Figura 6: Visualización microscópica de la tinción de gram. A. *E.coli*, bacilos gram negativos. B. *P.aeruginosa*, bacilos gram negativos. C. *B.anthraxis*, bacilos gram positivos.

Los medios de crecimiento selectivo y/o diferencial permitieron verificar la identidad de los microorganismos. Los resultados obtenidos concordaron con lo esperado ya que para el caso de *E.coli* en MCC se observaron colonias rojas y en TSI se observó fondo y superficie amarillo, presencia de gas y producción de ácido sulfhídrico positivo. En cuanto a *P.aeruginosa* en AC se observaron colonias amarillo verdosas o marrones

amarillentas y en TSI se observó fondo y superficie rojo, ausencia de gas y sin producción de ácido sulfhídrico.

4.2 Aspecto físico del producto, determinación del porcentaje de viabilidad y análisis estadístico.

4.2.1 Aspecto físico y reconstitución de los viales.

Una característica evaluada en este trabajo fue el aspecto físico de los productos secos finales como parámetro indicativo de una correcta liofilización.

Se comenzó evaluando el aspecto físico obtenido a distintos tiempos de liofilización. Esto se realizó utilizando como lioprotector L10 y los tiempos evaluados fueron 24 y 48 horas. Se observó que los productos liofilizados durante 48 horas presentaban una estructura con grietas (Figura 7) mientras que los liofilizados durante 24 horas contenían una estructura definida y uniforme (Figura 8), razón por la cual se continuó trabajando con este tiempo de liofilización.



Figura 7. Producto liofilizado de *E.coli* liofilizado en L10 durante 48 hs. presentando una estructura con grietas.



Figura 8. Producto de *E.coli* con aspecto esperado utilizando L10 como lioprotector liofilizado durante 24 hs.

En los casos de los productos liofilizados utilizando L10 y L20, L10G1 y L20G1 y L10S10 se observó como resultado una torta con aspecto esperado de estructura definida, superficie cóncava y de color blanco amarillento. A su vez presentaron un leve encogimiento y se observó material residual adherido a las paredes del vial (Figura 8). En cuanto al brillo, las tortas formuladas únicamente por leche (L10 y L20) resultaron opacas, en comparación con aquellas que contenían una mezcla de lioprotectores que presentaron un aspecto más brillante (Figura 9).



Figura 9. Productos liofilizados durante 24 hs. utilizando distintos lioprotectores. A la izquierda *E.coli* L10, a la derecha *E.coli* L10S10.

Por otro lado, los productos liofilizados utilizando como medio lioprotector L10G10 resultaban en una estructura no definida con espuma esparcida por todo el vial, no cumpliendo con las características esperadas (Figura 10). Por este motivo, esta formulación fue descartada.



Figura 10. Productos liofilizados de *P.aeruginosa* durante 24 hs. utilizando L10G10 como lioprotector.

En cuanto a los productos secos utilizando únicamente S10 como lioprotector, al finalizar la liofilización presentaron una estructura definida con superficie cóncava, opaca y de color blanco, cumpliendo con el aspecto esperado. A su vez, se observó un leve encogimiento y una mínima cantidad de material residual adherido a las paredes. Sin embargo, luego de someterlos a la prueba de estabilidad acelerada estos sufrieron un notorio encogimiento (Figura 11).

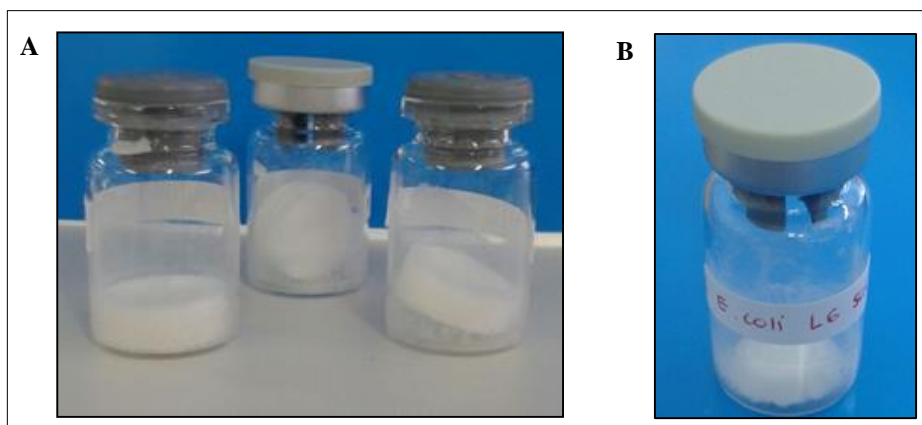


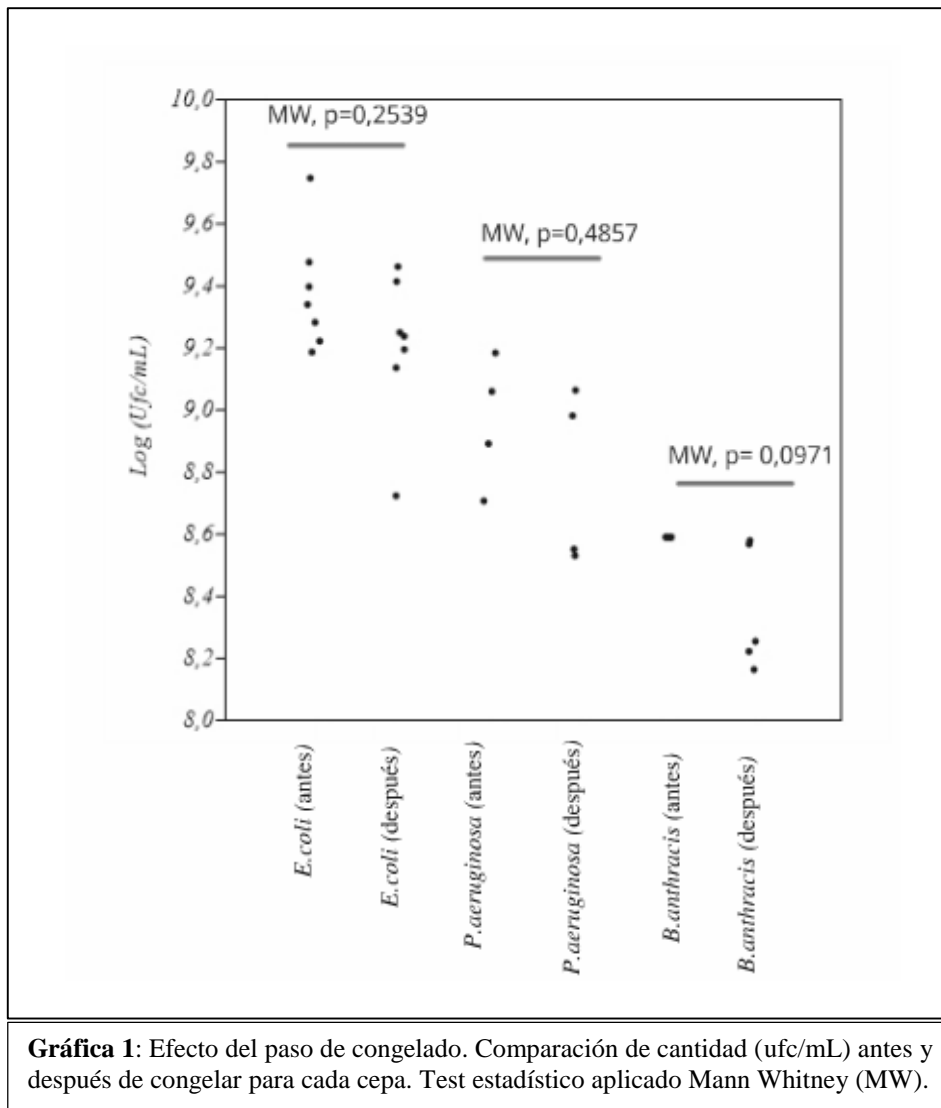
Figura 11. Productos secos liofilizados en presencia de sacarosa durante 24 hs. A. *P.aeruginosa* luego de la liofilización. B. *P.aeruginosa* luego de la prueba de estabilidad acelerada.

Para la reconstitución, se utilizó en todos los casos medio de cultivo NB. Cabe mencionar que aquellos productos que dentro de su formulación contenían leche al 20% (L20 y L20G1) presentaban mayor dificultad a la hora de reconstituir que los formulados con leche al 10% (L10, L10G1 y L10S10) o los formulados utilizando únicamente sacarosa (S10).

4.2.2 Efecto del paso de congelado en la viabilidad celular

Se evaluó la pérdida de viabilidad durante el paso de congelado a -80°C . El número de células/mL luego del congelado se determinó descongelando a temperatura ambiente un vial del lote a liofilizar.

En la gráfica 1 se puede observar que la diferencia entre la cantidad de células (ufc/mL) previo al paso de congelado y luego del mismo no son notorias. Esto se confirmó mediante test estadístico y se observó que no existían diferencias significativas (*E.coli*, MannWhitney $p=0,2539$, *P.aeruginosa*, Mann Whitney $p=0,4857$, *B.anthraxis*, Mann Whitney $p=0,0971$) Cabe destacar que este estudio se realizó para las formulaciones *E.coli* L10, *P.aeruginosa* L10 y *B.anthraxis* L10G1.

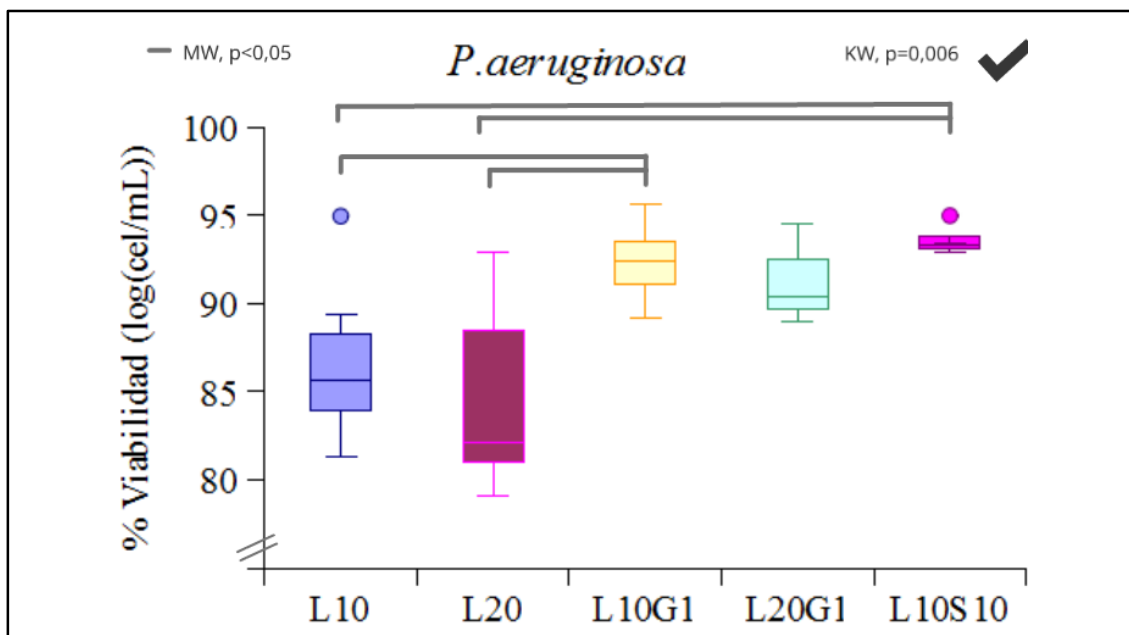


4.2.3 Recuperación de microorganismos post-liofilización

En primer lugar se evaluó si existían diferencias en la recuperación de microorganismos utilizando distintos tiempos de liofilización, 24 horas y 48 horas. Este estudio fue realizado para el caso de *E. coli* en L10. Al comparar los recuentos celulares entre los liofilizados durante 24 horas y los liofilizados durante 48 horas no se observaron diferencias significativas (Mann Whitney, $p=0.2703$). Estos resultados soportan que el tiempo utilizado para el resto de las liofilizaciones haya sido 24 horas (Figura 7 y 8).

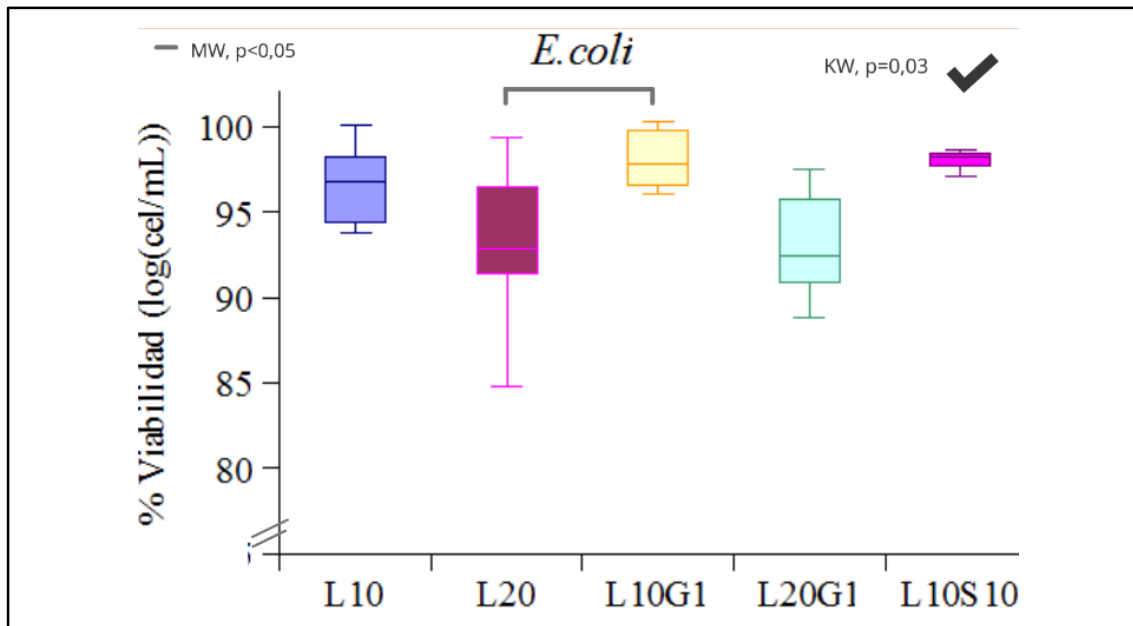
Se evaluó el comportamiento de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *B. anthracis* en distintos medios lioprotectores. Se analizó mediante diagrama de cajas los porcentajes de viabilidad obtenidos en los distintos tratamientos realizados para los distintos microorganismos en estudio.

En el caso de *P.aeruginosa* se encontró que existían diferencias significativas (Kruskal Wallis, $p=0,006$) en los porcentajes de viabilidad comparando los diferentes lioprotectores. Las formulaciones combinadas L10G1 y L10S10 tuvieron porcentajes de viabilidad significativamente mayores que los logrados con L10 y L20 (Mann Whitney, $p<0,05$ en todos los casos). Para el caso de L20G1 no se encontraron diferencias significativas al compararlo con L10 y L20 (Mann Whitney, $p>0,05$). A su vez, se confirmó la tendencia observada en el diagrama de cajas (gráfica 2) donde se puede observar que aquellas formulaciones conteniendo mezclas de lioprotectores logran alcanzar mayores viabilidades. En cuanto al número de células, se partió de una concentración de células de 10^9 ufc/mL aproximadamente y al utilizar las formulaciones con mejores porcentajes de recuperación se obtuvo al menos 10^8 ufc/mL.



Gráfica 2: Porcentaje de viabilidad de *P.aeruginosa* considerando el logaritmo de los recuentos celulares (ufc/mL) antes y luego de liofilizar durante 24 hs. para cada medio lioprotector formulado. Existen diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad utilizando el test no paramétrico Kruskal Wallis ($p=0,006$). Las líneas indican los casos en los que existían diferencias significativas utilizando Mann Whitney ($p<0,05$).

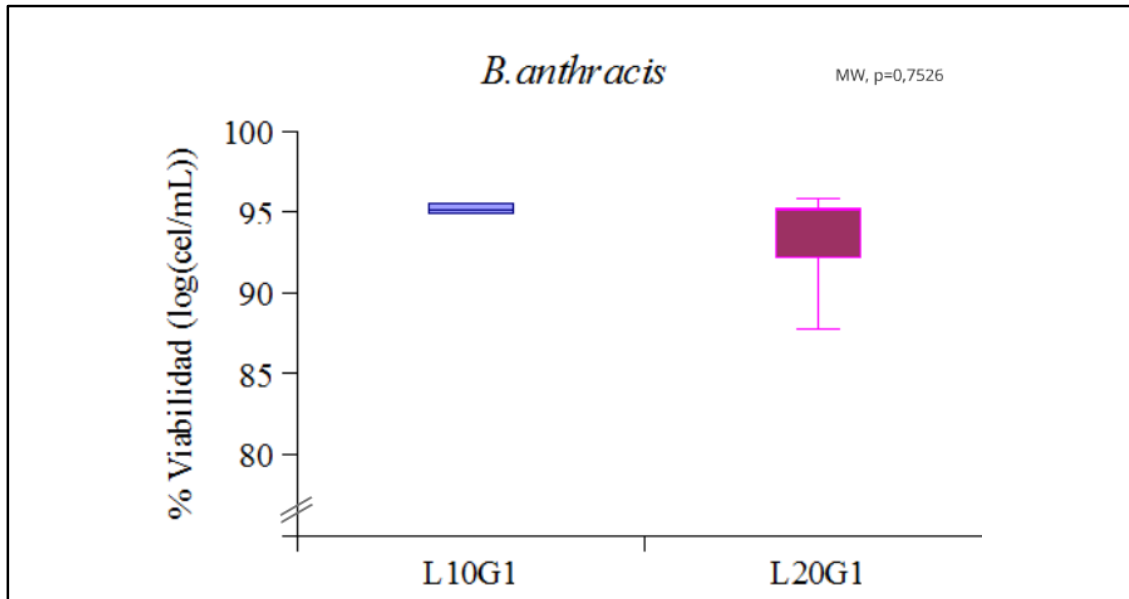
Al evaluar los porcentajes de viabilidad de *E.coli* con los distintos lioprotectores se observó que existían diferencias significativas (Kruskal Wallis, $p=0,03$). En la gráfica 3 se puede destacar que los porcentajes de viabilidad alcanzados con L10S10 y L10G1 son mayores que los presentados por el resto de lioprotectores utilizados. Al evaluar par a par sólo se encontraron diferencias significativas entre L10G1 y L20 (Mann Whitney, $p=0,04$). En cuanto al número de células, se partió de una concentración de 10^9 ufc/mL y en el caso de L10S10 y L10G1 se mantuvo el orden.



Gráfica 3: Porcentaje de viabilidad de *E.coli* considerando el logaritmo de los recuentos celulares (ufc/mL) antes y luego de liofilizar durante 24 hs. para cada medio lioprotector formulado. Existen diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad utilizando el test no paramétrico Kruskal Wallis ($p=0,03$). Las líneas indican los casos en los que existían diferencias significativas utilizando Mann Whitney ($p<0,05$).

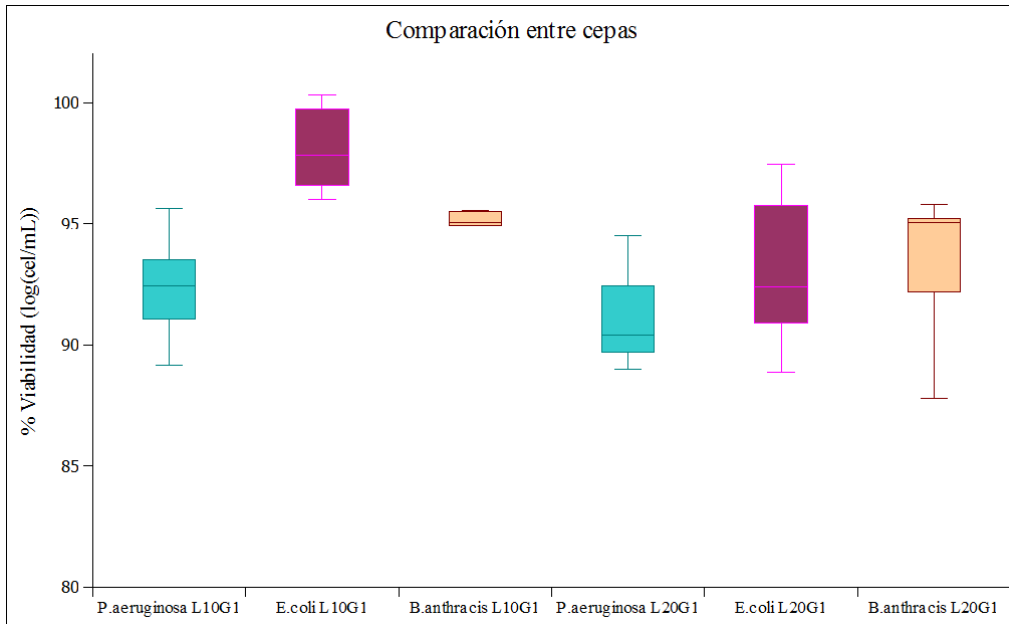
Al probar *E.coli* y *P.aeruginosa* utilizando S10 como lioprotector, inmediatamente después de liofilizar se obtuvieron resultados satisfactorios de viabilidad, bajando únicamente un orden de células, partiendo de un orden de 10^9 ufc/mL. Sin embargo, como se mencionó anteriormente no cumplían con el aspecto físico deseado luego de la prueba de estabilidad y por lo tanto este lioprotector fue descartado.

En el caso de *B.anthraxis* no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad de las formulaciones utilizadas (L20G1 y L10G1) (Mann Whitney, $p=0,7526$). Cabe mencionar sin embargo, que al observar el diagrama de cajas, los lotes analizados de L10G1 presentaron una menor variabilidad lo que se refleja en una menor dispersión de los datos en comparación con lo obtenido con L20G1 (Gráfica 4). Por lo tanto, existiría una tendencia a una mayor reproducibilidad. En cuanto al número de células, se partió de una concentración de células de 10^8 ufc/mL y en todos los casos se mantuvo el orden.



Gráfica 4: Porcentaje de viabilidad de *B.anthraxis* considerando el logaritmo de los recuentos celulares (ufc/mL) antes y luego de liofilizar durante 24 hs. para cada medio lioprotector formulado. No existen diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad utilizando el test no paramétrico Mann Whitney ($p=0,7526$).

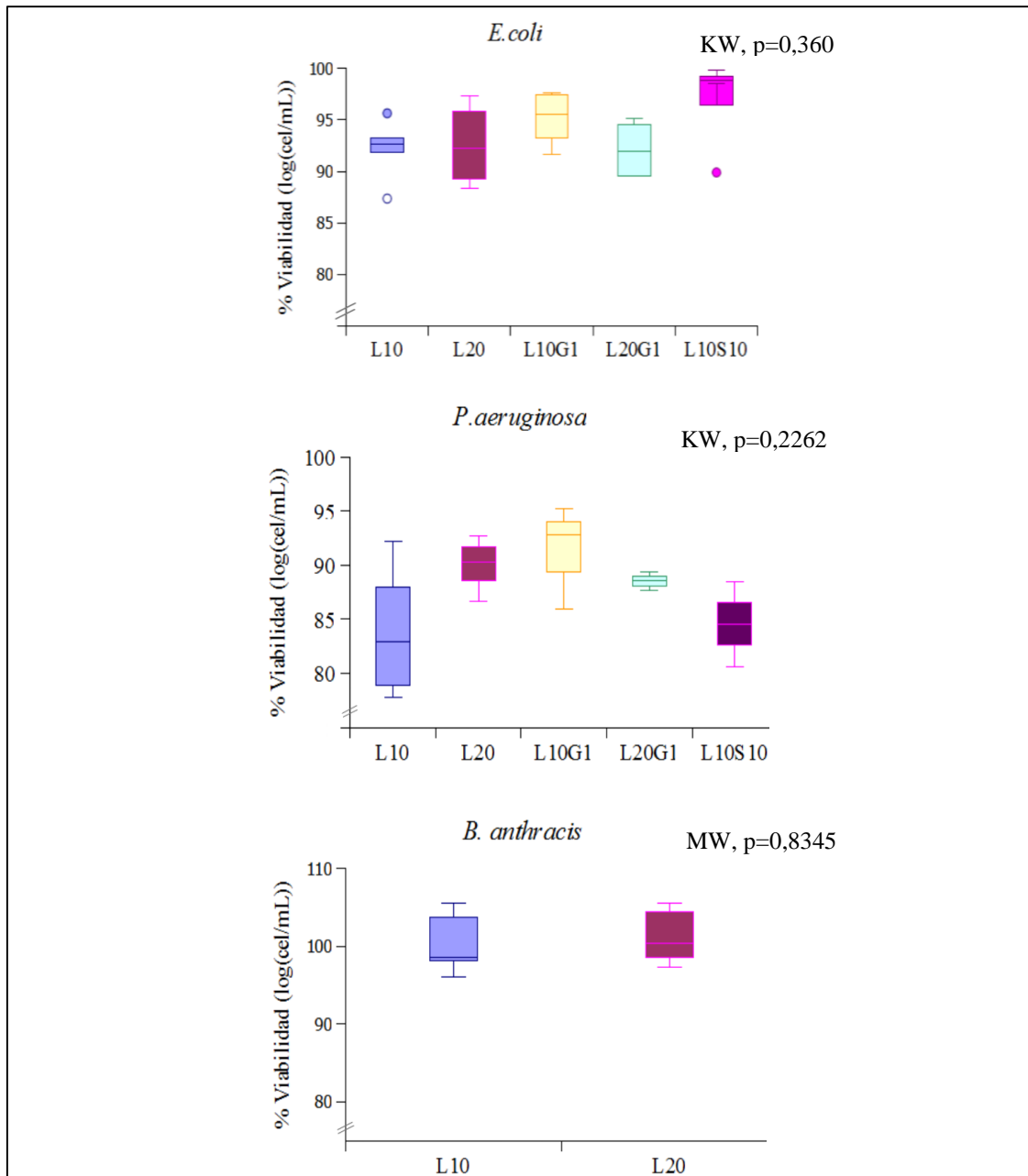
Con el fin de visualizar el comportamiento de diferentes cepas bajo el mismo tratamiento se realizaron diagramas de cajas (Gráfica 5). Esto se realizó únicamente para L10G1 y L20G1, ya que estos tratamientos fueron realizados en todas las cepas en estudio. Como se puede observar en la gráfica 5, en todos los casos se alcanzan viabilidades superiores al 90%, igualmente se puede destacar que frente a un pequeño cambio en la concentración de leche las cepas mostraron distinto comportamiento. En L20G1 se puede observar que existe una tendencia a que *B.anthraxis* alcanza mejores resultados en cuanto a la viabilidad celular. Sin embargo, para el caso de L10G1 los mejores resultados se obtienen con *E.coli*.



Gráfica 5. Porcentaje de viabilidad de *B.anthraxis*, *E.coli* y *P.aeruginosa* considerando el logaritmo de los recuentos celulares (ufc/mL) antes y luego de liofilizar durante 24 hs. para L10G1 y L20G1.

4.2.4 Prueba de estabilidad

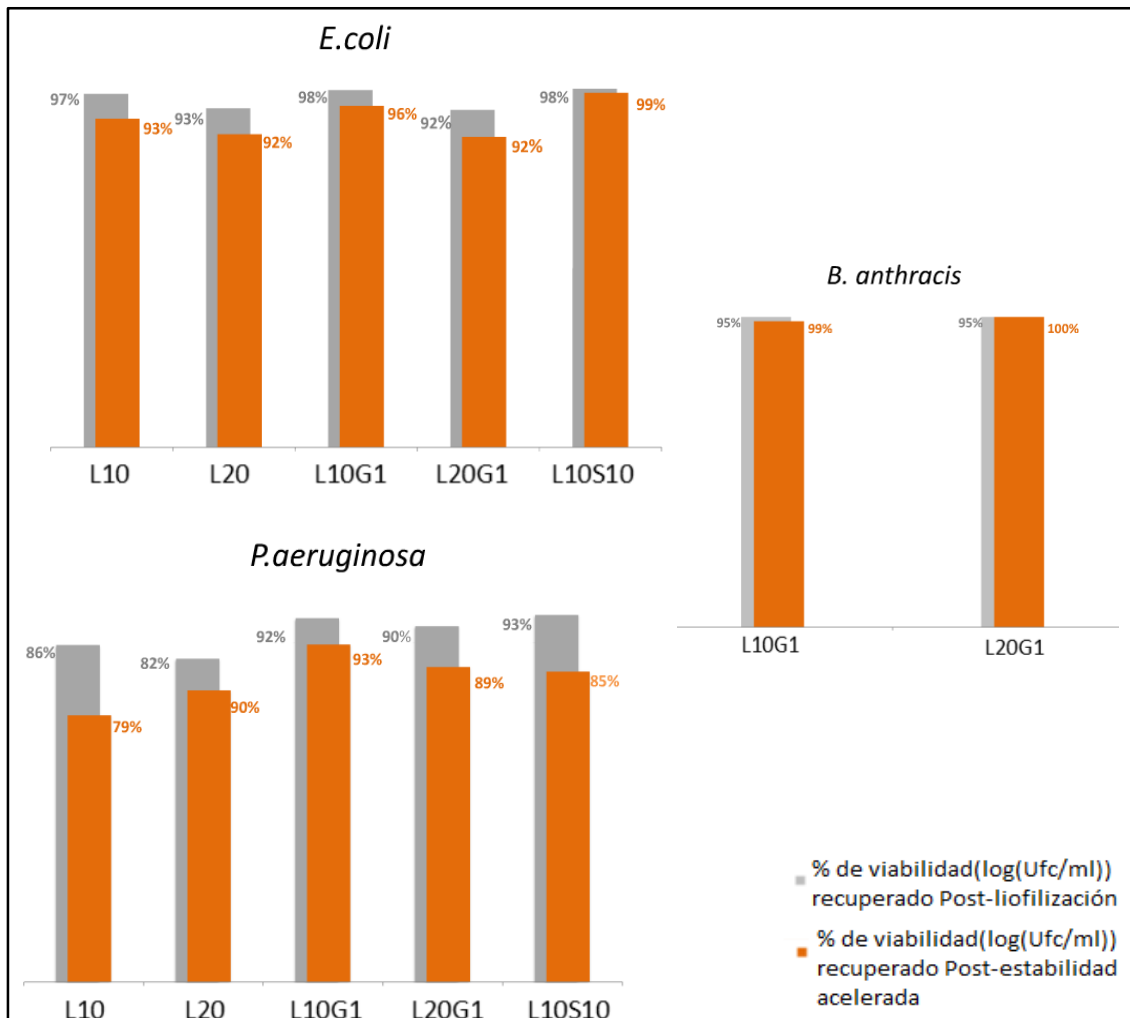
Al evaluar el efecto del almacenamiento a largo plazo en la viabilidad celular se realizó una prueba de estabilidad acelerada en la cual se sometieron los viales a 37°C durante 5 días. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad entre las formulaciones analizadas (*P.aeruginosa*, Kruskal Wallis $p=0,2262$; *E.coli*, Kruskal Wallis $p= 0,360$; *B.anthraxis*, Mann Whitney $p= 0,8345$) (Gráfica 6).



Gráfica 6: Porcentaje de viabilidad considerando el logaritmo de los recuentos celulares medidos en ufc antes y después de la prueba de estabilidad acelerada. Se aplicaron los test de Kruskal Wallis y Mann Whitney. A. *E.coli* (KW, $p= 0,360$), B. *P.aeruginosa* (KW, $p=0,2262$), C. *B.anthraxis* (MW, $p= 0,8345$).

Por otro lado se pudo comprobar que en caso que los viales no fuesen sellados correctamente al vacío, su viabilidad luego de la prueba de estabilidad acelerada disminuía bruscamente, reduciendo así su recuento celular por lo menos 3 órdenes con respecto al recuento luego de la liofilización.

En la gráfica 7 se realizó una comparación entre la viabilidad obtenida luego de liofilizar y luego de la prueba de estabilidad acelerada, tomando como 100% la viabilidad obtenida post-liofilización. Se puede observar para el caso de *E.coli* que todos los casos presentaron resultados mayores al 90% tanto luego de liofilizar como luego de la prueba de estabilidad, por lo tanto se puede apreciar que mostro un comportamiento estable. En cuanto a *P.aeruginosa*, si bien no mostro resultados de viabilidad tan altos como *E.coli*, igualmente muestra altas tasas de recuperación, destacándose la mezcla de lioprotectores L10G1, la cual resulto en un producto más estable con respecto al resto de las formulaciones. Por último, *B.anthraxis* mostro resultados exitosos en cuanto a la viabilidad celular, observando que los dos lioprotectores ensayados permitieron obtener un producto estable con altas tasas de recuperación celular luego de la prueba de estabilidad.



Gráfica 7: Comparación entre la viabilidad luego de liofilizar y luego de la prueba de estabilidad acelerada. Se toma como 100% la viabilidad obtenida post-liofilización.

Teniendo en cuenta estos resultados, todos los lioprotectores ensayados permitieron formular un producto estable con capacidad de conservación. Por otro lado, las diferencias entre los lioprotectores son más notorias en los porcentajes de viabilidad obtenidos post- liofilización, mostrando mayores tasas de recuperación célula aquellas formulaciones compuestas por una mezcla de lioprotectores. Este análisis permitió tener una perspectiva del comportamiento del producto liofilizado luego de pasado un año en condiciones normales.

5 Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo poner a punto un protocolo de liofilización que permita preservar el cepario a partir de los cuales se producen los antígenos vacunales en la empresa Laboratorios Microsules. Como microorganismos modelos se utilizó la cepa *E.coli* ATCC® 8739, *P.aeruginosa* ATCC® 9027 y la cepa Sterne *B.anthraxis*. A su vez se evaluó la estabilidad de los productos liofilizados.

La liofilización es un método conveniente y relativamente sencillo para la preservación de bacterias. La tolerancia a este proceso depende de la especie, del medio lioprotector, del estado fisiológico de las células, la concentración inicial celular, la velocidad de congelado, los parámetros del ciclo de liofilización y las condiciones de rehidratación (26). El presente trabajo se enfocó en el estudio de diferentes fórmulas de lioprotectores para las cepas mencionadas anteriormente.

La formulación es un paso clave ya que diversos trabajos han mostrado que el uso de lioprotectores permite mejorar la recuperación de microorganismos luego de liofilizados. Se ha visto que su uso aumenta la viabilidad celular en hasta tres unidades logarítmicas en comparación a los microorganismos resuspendidos en agua (26, 41). De todos modos es esperable que haya una disminución en el recuento de células viables luego de la liofilización en comparación con el cultivo de partida, debido al estrés sufrido (34). El porcentaje de viabilidad no es el único parámetro importante o útil a la hora de evaluar la efectividad del proceso de liofilización, es importante también considerar el recuento celular post liofilización. Cuando el fin de los microorganismos liofilizados es que actúen como iniciadores de un cultivo es suficiente con que las cepas liofilizadas sean capaces de dar lugar al mismo con las mismas características fenotípicas y genotípicas que el cultivo inicial (42). Considerando que el fin del presente trabajo es generar bancos bacterianos maestros y de trabajo, se puede apreciar que el número de células alcanzado en el producto liofilizado en todos los casos es un número aceptable para dicho objetivo.

Durante la liofilización las bacterias son sometidas a estreses como la congelación y la desecación. Un parámetro a tener en cuenta es el modo y la temperatura de congelado, se han planteado diversas metodologías para el congelado de los microorganismos previo a la liofilización (17, 26, 27). Uno de los métodos utilizados es la congelación a -80°C (18, 34). En el presente trabajo se utilizó esta temperatura para el paso de congelado, dicho paso no resultó ser un punto crítico del proceso lo que concuerda con el estudio realizado por Ming *et al.* (2009). En dicho estudio se concluye que -80°C es una temperatura óptima para mantener la viabilidad celular ya que el congelado a estas temperaturas potencia la velocidad de nucleación, dando como resultado cristales de tamaño pequeño lo que reduce el daño en la membrana celular (35).

Al evaluar la capacidad lioprotectora de la leche en polvo descremada reconstituida al 10% y al 20% no se observaron diferencias estadísticas en la viabilidad, si bien si se pudo apreciar una tendencia a obtener mayor viabilidad al utilizar L10. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Berner *et al.* (2006) donde obtienen mejores resultados utilizando leche al 10% que utilizando leche al 15% (18). En el proceso de liofilización la leche juega un rol importante en la creación de una estructura porosa en el producto liofilizado, lo que facilita la rehidratación (22). Con respecto a la reconstitución del producto seco, cabe destacar que resultó más fácil de reconstituir aquellos productos

formulados con leche al 10% (L10, L10G1 y L10S10) en comparación al 20% (L20 y L20G1).

Otro lioprotector comúnmente utilizado es la sacarosa, la misma actúa estabilizando las membranas y las proteínas (35). En estudios realizados por Leslie, *et al.* (1995) concluyen que *E.coli* y *Bacillus thuringiensis* en presencia de sacarosa muestra tolerancia a la liofilización (34). Los resultados de este trabajo mostraron una buena recuperación post liofilización al utilizar sacarosa al 10% como lioprotector. Sin embargo, durante el estudio de estabilidad, el producto no cumplió con el aspecto físico deseado, por lo cual se descartó el uso de dicha formulación. Esto se relaciona con el estudio realizado por Zayed, *et al.* (2004), donde usando sacarosa al 4% sostienen que si bien el producto luego de liofilizado en presencia de sacarosa muestra rango aceptables de viabilidad, la misma disminuye bruscamente en la etapa de almacenamiento (41).

Una forma de mejorar tanto la viabilidad como la estructura física de un producto liofilizado es mezclar diferentes lioprotectores (18). En este trabajo se realizaron mezclas de leche descremada con sacarosa y leche descremada con glicerol a distintas concentraciones. En estudios realizados por Zayed *et al.* (2004), obtuvieron mejores resultados al utilizar mezcla de leche y sacarosa en comparación a utilizarlos cada uno por separado (41). A su vez, un estudio de liofilización publicado por Abadias *et al.* (2000) para *Candida sake* mostraron que formular con 10% de leche descremada en combinación con 10% de sacarosa tiene un efecto protector mayor que al utilizar sacarosa sola (27). Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, donde la mezcla de leche con sacarosa dio mejores resultados en cuanto a la viabilidad celular en comparación a cuando se utiliza solo leche o solo sacarosa. La solución solo se ensayó para *E.coli* y *P.aeruginosa*, sería interesante evaluar el desempeño de este lioprotector para *B.anthraxis*. Como se mencionó anteriormente, otra mezcla de lioprotectores utilizada en este trabajo fue leche más glicerol. En estudios realizados por Lijin Huang, *et al.* (2006) afirman que esta interacción da como resultado una alta viabilidad luego del proceso de liofilización (22). Esto concuerda con lo observado en este trabajo, donde los porcentajes de viabilidad con L10G1 presentaron diferencias significativas en comparación con aquellos que fueron liofilizados con L10 y L20. En el presente trabajo se utilizó L10G1, L20G1 y L10G10. En el caso de liofilizar utilizando L10G10 el aspecto físico obtenido no fue el deseado ya que la muestra alcanzó su punto de ebullición durante el proceso, las propiedades físicas de esta formulación no fueron adecuadas para soportar el proceso de liofilización. Debido a esto se decidió bajar la concentración de glicerol de 10% a 1% en formulaciones posteriores. Esto apoya lo mencionado por Abadias *et al.* (2000) que afirma que el incremento de la concentración del glicerol del 1% al 10% no es conveniente ya que no se obtiene un producto completamente seco (27). A su vez, estos resultados concuerdan con lo mencionado por Ming *et al.* (2009) donde afirman que la alta concentración de agentes protectores no siempre es deseable cuando se utiliza una mezcla de agentes de protección (35). Se puede observar que un pequeño cambio en la concentración de leche descremada genera una variación en los resultados.

Como se pudo observar, leche al 10% ya sea con glicerol al 1% o con sacarosa al 10% actúan como adecuados lioprotectores, alcanzando altas tasas de recuperación. Debido a que el lioprotector L10G1 tuvo un buen desempeño para todas las cepas analizadas, sería importante evaluar dicho lioprotector en el cepario de la empresa y corroborar su efectividad en las cepas de interés para su implementación. Es interesante seleccionar un

lioprotector que tenga un buen desempeño para más de un tipo de microorganismo, ya que permite simplificar el proceso, reducir tiempos de manufactura y eventualmente costos. Cabe recordar que el lioprotector L10S10 tuvo un correcto desempeño en *P.aeruginosa* y en *E.coli*, siendo otro candidato a ser evaluado.

Uno de los objetivos principales de la generación de bancos maestros y de trabajo es la posibilidad de conservarlos a largo plazo. En vista de esto se evaluó la estabilidad del producto a través de una prueba de estabilidad acelerada. Los lioprotectores utilizados en el presente trabajo lograron que los microorganismos fueran estables luego de la prueba. A su vez, ninguno de los lioprotectores presentó diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular obtenida en las tres cepas utilizadas. Sería importante realizar una prueba de estabilidad natural que permita corroborar lo observado y a su vez establecer la vida útil de los bancos de trabajo. Cabe destacar que en el caso de la prueba de estabilidad acelerada en *B.anthraxis* se observó una tendencia a mantener su viabilidad, esto puede deberse a que es un microorganismo esporulado.

Un factor a considerar en cuanto al almacenamiento de microorganismos liofilizados es la actividad de agua del producto terminado. Para reducir el número de moléculas de agua el proceso de liofilización y el sellado de los viales al vacío debe haber sido exitoso y así obtener un producto con el contenido de humedad deseado. A su vez, la actividad de agua puede ser reducida almacenando a temperaturas de al menos 4°C (23). Se pudo comprobar que el sellado al vacío y precintado es un punto crítico para mantener la viabilidad durante el almacenamiento, ya que viales no sellados correctamente mostraron una importante reducción en el número de células luego de haber pasado por la prueba de estabilidad acelerada. Esto se relaciona con la hipótesis de que el proceso de liofilización causa un daño en la membrana de las células bacterianas que es reparado parcialmente cuando se reconstituye con medio nutriente, pero al no sellarse al vacío la exposición al oxígeno convierte este daño en irreversible (43). Cabe considerar que productos liofilizados aún sellado al vacío presentan humedad residual y dicha cantidad está relacionada con el tipo de lioprotector utilizado (17, 23, 41).

Existen parámetros que afectan la viabilidad del producto liofilizado que no fueron tenidos en cuenta en este trabajo, como la edad del cultivo y las condiciones del medio en el cual se crecen los microorganismos (15, 17, 24). Estos parámetros se proponen como puntos de partidas para realizar ajustes menores en el protocolo con el fin de lograr mejores resultados.

Se logró obtener un protocolo de liofilización que sirva para la generación de bancos de trabajos y maestros para la conservación de cepas bacterianas. A su vez, se determinaron algunos puntos críticos del proceso de liofilización.

6 Análisis Económico

En el presente trabajo el análisis económico no aplica debido a que el liofilizador utilizado es a escala de laboratorio y no tiene un fin comercial. La liofilización de las cepas es un evento esporádico que tiene como fin respaldar el cepario de la empresa siguiendo buenas prácticas de laboratorio y utilizando más de una técnica, en este caso la liofilización, según lo recomendado por la WFCC.

7 Conclusiones

Se logró poner a punto un protocolo de liofilización para cepas bacterianas, el cual fue provisto a Laboratorios Microsules.

Los productos liofilizados presentaron un correcto aspecto físico, de fácil rehidratación, con altas tasa de recuperación celular y pasaron la prueba de estabilidad acelerada. Leche descremada reconstituida al 10% más glicerol al 1% y leche descremada reconstituida al 10% más sacarosa al 10% fueron las mezclas de lioprotectores seleccionadas como candidatas a ser probadas en el cepario de la empresa.

8 Referencias Bibliográficas

- 1 Adams G. The Principles of Freeze-Drying. En: Day JG, Stacey GN, editors. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2nd ed. New Jersey: Humana Press Inc.; 2007. pp 15-38.
- 2 Hoefman S, Van Hoorde K, Boon N, Vandamme P, De Vos P, Heylen K. Survival or Revival: Long-Term Preservation Induces a Reversible Viable but Non-Culturable State in Methane-Oxidizing Bacteria. PLoS One. 2012; 7(4): 1-9.
- 3 Louis P, Trüper HG, Galinski EA. Survival of Escherichia coli during drying and storage in the presence of compatible solutes. Applied Microbiology and Biotechnology. 1994; 41(6): 684-688.
- 4 Day JG, Stacey GN. Long-Term Ex Situ Conservation of Biological Resources and the Role of Biological Resource Centers. En: Day JG, Stacey GN, editors. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2nd ed. New Jersey: Humana Press Inc.; 2007. pp 1-14.
- 5 Safronova VI, Novikova NI. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen-freezing. Journal of Microbiological Methods. 1996; 24(3): 231-237.
- 6 Cameotra SS. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007; 353(4): 849–850.
- 7 WFCC. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos [Internet]. [Lugar desconocido]: WFCC; Febrero 2010 [citado 2015 enero 10] Disponible desde: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_01.pdf
- 8 ATCC. ATCC® Bacterial Culture Guide tips and techniques for culturing bacteria and bacteriophages [Internet]. Virginia: ATCC; [Fecha desconocida] [citado 2015 enero 25] Disponible desde: http://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Previews/ATCC_Bacterial_Culture_Guide_Preview.ashx
- 9 Hwang SW. Long-Term Preservation of Fungus Cultures with Liquid Nitrogen Refrigeration. Applied Microbiology. 1966; 14(5): 784–788.
- 10 Teather RM. Maintenance of Laboratory Strains of Obligately Anaerobic Rumen Bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 1982; 44(2): 499–501.
- 11 Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. Cryobiology. 2006; 52(1): 27-32.

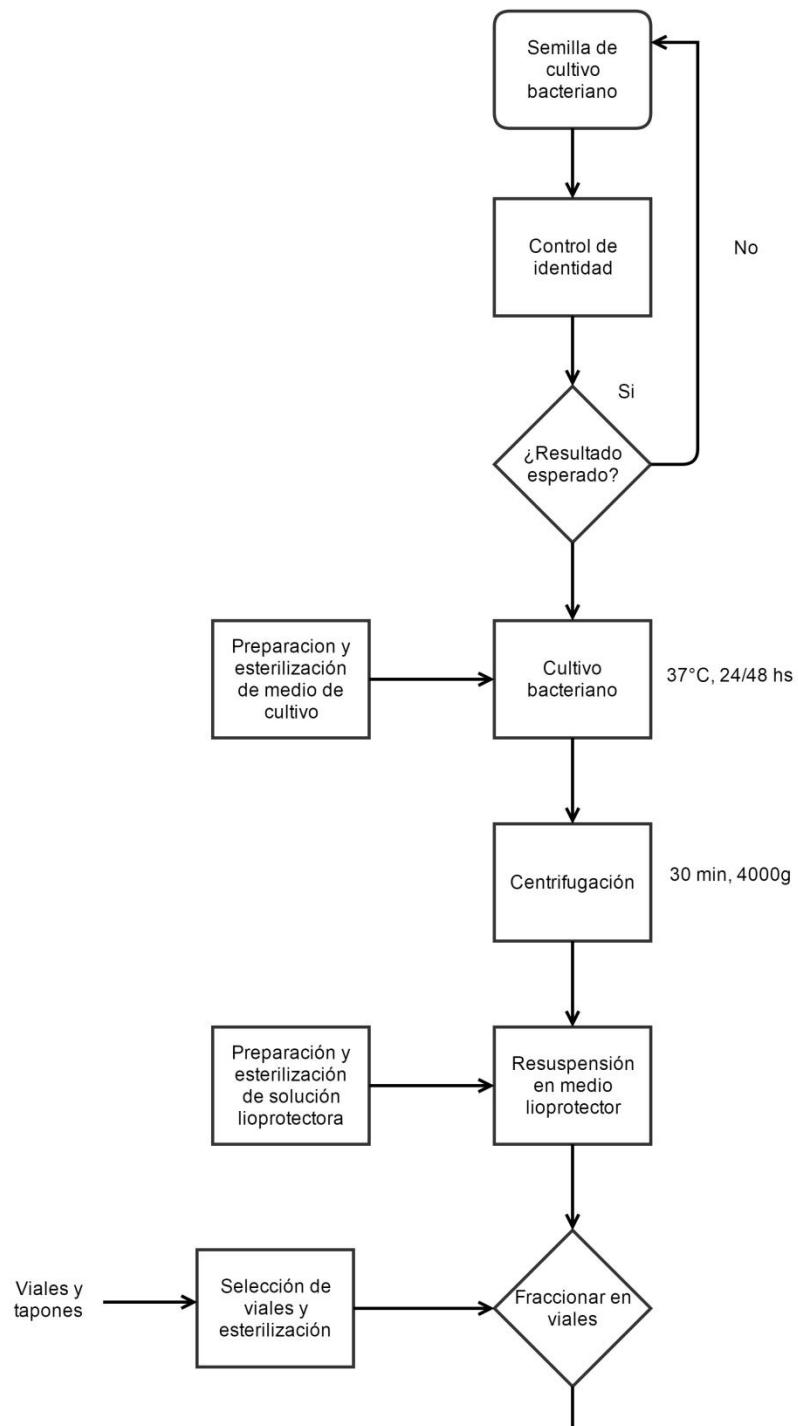
- 12 Jennings TA. Lyophilization Introduction and Basic Principles. 1st ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 1999.
- 13 OPS Diagnostics. Bacteria Lyophilization Overview [Internet] New Jersey: OPS Diagnostics; [Fecha desconocida] [citado 2014 diciembre 11]. Disponible desde: http://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/bacteria_lyophilization_overview.htm
- 14 Perry SF. Freeze-Drying and Cryopreservation of Bacteria. *Molecular Biotechnology*. 1998; 9 (1): 59-64.
- 15 Portner DC, Leuschner R, Murray B. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54(3): 265–270.
- 16 Yang C, Zhu X, Fan D, Mi Y, Luo Y, Hui J, Ran S. Optimizing the Chemical Compositions of Protective Agents for Freeze-drying *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2012; 20(5): 930–936.
- 17 Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*. 2006; 66(2): 183–193.
- 18 Berner D, Viernstein H. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Scientia Pharmaceutica*. 2006; 74(3): 137-149.
- 19 Wang W, Chen M, Chen G. Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2012; 20(3): 551–559.
- 20 Nireesha GR, Divya L, Sowmya C, Venkateshan NNBM, Lavakumar V. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*. 2013; 3(4): 87-98.
- 21 Kupletskaya MB, Netrusov AI. Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology*. 2011; 80(6): 850-853.
- 22 Huang L, Lu Z, Yuan Y, Lü F, Bie X. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2006;33(1):55-61.
- 23 Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2008; 54(1): 9-24.
- 24 Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried. *International Dairy Journal*. 2004; 14(10): 835–847.

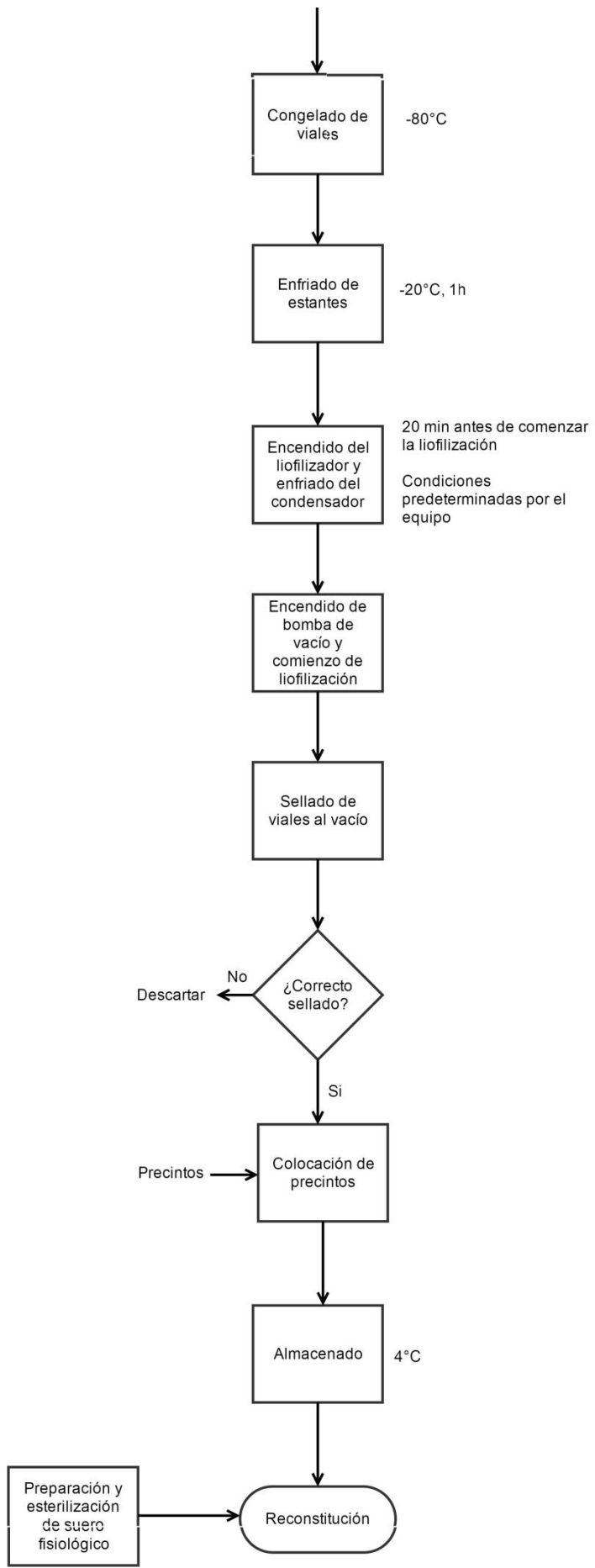
- 25 Schoug A. 2009. A Dry Phase of Life: Freeze-drying and storage stability of *Lactobacillus coryniformis* Si3 in sucrose-based formulations [Thesis]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- 26 Palmfeldt J, Radstrom P, Hahn-Hägerdal B. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*. 2003; 47(1): 21-29.
- 27 Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, Usall J, Viñas I. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001; 65(3): 173–182.
- 28 SP Scientific. BenchTop™ “K” Series Freeze Dryers [Internet]. Kakatiya Nagar: FirstSource Laboratory Solutions; [Fecha desconocida] [citado 2015 febrero 2]. Disponible desde: <http://www.firstsourcels.com/archive/BenchtopKseries.html>
- 29 OPS Diagnostics. Bacteria Freeze Drying Protocol [Internet] New Jersey: OPS Diagnostics; [Fecha desconocida] [citado 2015 enero 29]. Disponible desde: <http://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpbacteriafdprotocol.htm>
- 30 Conrad PB, Miller DP, Cielenski PR, J dPJ. Stabilization and Preservation of *Lactobacillus acidophilus* in Saccharide Matrices. *Cryobiology*. 2000; 41(1): 17-24.
- 31 Bozoğlu TF, Özilgen M, Bakir U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*. 1987; 9(9): 531–537.
- 32 Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46(3): 205–229.
- 33 Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*. 1983; 20(5): 560-566.
- 34 Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, H CJ, Crowe LM. Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61(10): 3592–3597.
- 35 Ming LC, Rahim RA, Wan HY, Ariff AB. Formulation of Protective Agents for Improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 Survival Rate Subjected to Freeze Drying for Production of Live Cells in Powderized Form. *Food and Bioprocess Technology*. 2009; 2(4): 431-436.

- 36 Schwegman JJ. Basic cycle development techniques [Internet]. Pensilvania: SP Scientific; Noviembre 2009 [citado 2014 Diciembre 15]. Disponible desde: <http://www.spscientific.com/ArticlesAndTechnicalPapers/>
- 37 Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G. Effect of Drying Medium on Residual Moisture Content and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985; 49(2): 413-415.
- 38 OIE. Principles of veterinary vaccine production [Internet]. Paris: Organización mundial de sanidad animal; 2012 [citado 2015 febrero 17]. Disponible desde: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VACCINE_PRODUCTION.pdf
- 39 Mputu Kanyinda JN, J D, Noki P, Thonart P. Accelerated storage testing of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* BTP1, BB2 and PI9 strains. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11(95): 16187-16191.
- 40 Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001; 4(1): 1-9.
- 41 Zayed G, Roosb YH. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*. 2004; 39(9): 1081-1086.
- 42 Heckly RJ. Preservation of Bacteria by Lyophilization. *Advances in Applied Microbiology*. 1961;3: 1-76.
- 43 Israeli E, Giberman E, Kohn A. Membrane malfunctions in freeze-dried *Escherichia coli*. *Cryobiology*. 1974; 11(5): 473-477.

9 Anexos

Anexo 1. Diagrama de flujo del protocolo de liofilización.





Anexo 2. Protocolo del proceso.

A continuación se muestra el Procedimiento Operativo Estándar entregado a la empresa Laboratorios Microsules respetando el formato establecido.

	PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD	Código PRLB-077
	PROTOCOLO DE LIOFILIZACION PARA BANCOS MAESTROS Y DE TRABAJO	Versión 01
		Vigente desde:
		Página 1 de 3

1. Objetivo

El objetivo de este procedimiento es definir un protocolo de liofilización para la creación de bancos maestros y de trabajo

2. Campo de aplicación

Este procedimiento aplica a todos las cepas a conservar mediante el método de liofilización.

3. Responsables

Jefe de Control de Calidad
Analista de Control de Calidad

4. Definiciones

L10G1: leche descremada reconstituida al 10% más glicerol al 1%

5. Descripción/operaciones

No aplica

5.1 Materiales

- 5.1.1 Equipamiento/instrumentos de trabajo
- Estufa a 37 ± 1 °C
 - Freezer -80
 - Cabina de flujo laminar
 - Autoclave
 - Liofilizador
 - Centrífuga
 - Sellador
- 5.1.2 Reactivos/insumos
- Cepa a liofilizar
 - Medio de cultivo
 - Suero fisiológico (0,9 g/L)
 - Viales y tapones de butilo estériles
 - Precintos
- 5.1.3 Vestimenta y flujos de personal y materiales
Ver PRLB-034

Las versiones impresas de este documento se consideran NO controladas a menos que estén selladas como Copia Controlada y rubricadas por el responsable del sistema de documentación.

	PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD	Código PRLB-077
	PROTOCOLO DE LIOFILIZACION PARA BANCOS MAESTROS Y DE TRABAJO	Versión 01
		Vigente desde:
		Página 2 de 3

5.1.4

Habilidades del personal/entrenamiento

El personal técnico debe tener experiencia o un entrenamiento para este protocolo, que incluya conocimientos sobre técnicas biológicas asépticas de laboratorio y preparación, correcto manejo, y desecho de agentes biológicos. El personal debe además conocer los procedimientos y políticas de seguridad, así como entrenamiento en el uso de vestimenta y los equipos de laboratorios necesarios listados en la sección Equipamiento/instrumentos de trabajo.

5.2 Ejecución de las pruebas

5.2.1 Cultivo bacteriano:

Crear la cepa a liofilizar en 200 mL de su medio de cultivo correspondiente hasta alcanzar una concentración celular de 10^9 ufc/mL.

5.2.2 Preparación del lioprotector L10G1(100 mL):

Preparar 95 ml de leche descremada al 10% y esterilizar a 116°C, 15 minutos.

Preparar 5 mL de glicerol al 20% y esterilizar a 121°C, 15 minutos

Mezclar ambas soluciones.

5.2.3 Procesamiento celular previo a la liofilización

Centrifugar 200mL del cultivo a 20°C durante 30 minutos a 4000g.

Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 20mL de medio lioprotector.

Colocar 2 mL de la preparación en viales de vidrio previamente etiquetados y taparlos parcialmente con tapones de butilo con muesca. Colocar los viales en el freezer a -80°C durante 24 horas.

5.2.4 Liofilización

Colocar la bandeja del liofilizador en freezer a -20°C al menos 1 hora antes de la liofilización

Encender el liofilizador y comenzar el enfriado del condensador presionando el botón AUTO (hasta que alcance -60°C).

Retirar la bandeja del liofilizador del freezer, colocarla en el equipo y colocar los viales congelados a ser liofilizados, realizar este procedimiento lo más rápido posible para evitar el descongelado de la muestra.

Encender la bomba de vacío.

Comenzar la liofilización presionando el botón AUTO, iniciando así un ciclo predeterminado por el equipo.

Detener la liofilización a las 24 horas, para ello en primer lugar cerrar al vacío los viales bajando la tapa del liofilizador. Una vez sellados frenar la liofilización presionando el botón AUTO.

Retirar los viales del liofilizador y precintarlos.

Registrar en la bitácora asociada las horas de uso y los lotes de los productos liofilizados.

Almacenar los viales a 4°C.

	PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD	Código PRLB-077
	PROTOCOLO DE LIOFILIZACION PARA BANCOS	Versión 01
	MAESTROS Y DE TRABAJO	Vigente desde:
		Página 3 de 3

5.3 Interpretación de resultados

Evaluar color, brillo, estructura, encogimiento del producto seco final y la presencia o no de material residual adherido a las paredes del vial y registrar.

6. Registros asociados

No aplica

7. Otros documentos asociados

No aplica

8. Referencias

No aplica

Histórico de revisiones

Versión	Modificación(es)
01	N/A

Responsables de este documento	Nombre	Fecha			Firma
Redacción	Alin Grauer				
	Karin Grunberg				
	Sofía Zardo				
Revisión					
Aprobación					