

Observações sôbre a congelação do plasma humano para desidratação

por

Humberto T. Cardoso e Clotilde Pirro

Na técnica de secagem do plasma sanguíneo, usada modernamente, uma das fases preparatórias consiste na congelação do mesmo, nas paredes do recipiente em que vai ser desidratado, formando uma camada com espessura de cerca de 1.5 cm. A razão deste procedimento decorre de duas vantagens imediatas que se obtêm: uma, a superfície de evaporação fica extremamente aumentada, e outra, a utilização de frascos de menor capacidade, cheios até $\frac{3}{4}$ do seu volume.

Desde o surgimento destes métodos de secagem dos produtos biológicos (1), vários têm sido os recursos para a congelação prévia do material, nas paredes dos recipientes, chamada pelos americanos de "shell-freezing".

Inicialmente, eram empregadas temperaturas extremamente baixas, obtidas com neve carbônica, em álcool ou acetona.. Isto permitia uma congelação muito rápida, microcristalina, nas paredes dos continentes.

O uso da neve carbônica, entretanto, em instalações de grande capacidade, é desvantajosa, pelo seu elevado custo.

Com a guerra, diante das grandes necessidades de plasma e sôro secos, os técnicos procuraram resolver a congelação prévia por meio de sistemas resfriados mecanicamente. Em consequência, procurou-se averiguar até que ponto era necessário resfriar o banho, para provocar essa congelação, em condições satisfatórias.

Os resultados obtidos permitiram realizar tal operação, usando banhos de álcool ou outros líquidos de ponto de congelação muito baixo, resfriados a cerca de $-30^{\circ}\text{C}.$, por meio de sistema mecânicos de fácil manipulação.

Entre estes, o descrito por STRUMIA et al. (2), para o plasma sanguíneo, indica o uso de um sistema mecânico que resfria a cerca de $-35^{\circ}\text{C}.$ um banho de álcool, onde se acha imersa uma engrenagem destinada a girar lentamente os frascos.

(*) Recebido para publicação a 23 de Junho de 1945.

STRUMIA chama a atenção para o fato de que a refrigeração mecânica, com temperaturas superiores a -40°C ., não permite a formação direta da congelação nas paredes, em vista de se dar o super-resfriamento a cerca de -6° a -10°C . Isto determina a congelação em massa do material, ao invéz da formação das camadas periféricas.

Segundo esse autor, o congelamento imperfeito do plasma traz desvantagens na sua secagem posterior, tornando-a mais difícil e, às véses, incompleta.

Sugere, então, o mesmo um artifício: o de provocar uma congelação rápida num ponto do frasco, prosseguindo, daí, para formar a camada nas paredes. A operação, para isto, consiste em parar o mecanismo giratório dos frascos por uns dois a quatro minutos; na porção do frasco mergulhada no banho resfriado, a uma profundidade de 1.5 cm, aparece uma faixa de congelação, que o autor chamou de "*snap*" *freezing*. Desde que todos os frascos deram essa congelação local, faz-se girar novamente o mecanismo e forma-se, então, nas paredes dos frascos, uma camada perfeitamente igual à que se poderia obter com banhos mais resfriados, como no caso do emprego da neve carbônica.

Trabalhando com a aparelhagem da Precision Scientific Co. de Chicago, segundo STRUMIA, tivemos oportunidade de constatar que, empregando plasma normal de cavalo, sistematicamente a técnica acima referida fornecia ótimos resultados.

Na secagem posterior deste material, os dados fornecidos pelo autor são concordantes com os obtidos, como sejam tempo de secagem, humidade final, etc.

O uso do plasma humano normal, entretanto, tornou inconstantes esses resultados, chegando-se, mesmo, a obter, em certas partidas, alguns frascos incompletamente secos.

A causa deste fato reside na congelação imperfeita que, por motivos desconhecidos, não se obtém em certos lotes de plasma humano.

Embora STRUMIA, em seu trabalho antes citado, chamasse a atenção para o fato de que, *ocasionalmente e por causas não aparentes, um ou outro frasco leve mais tempo a dar a congelação local "snap-freezing"*, chegamos a ter partidas que não davam esse fenômeno senão em cerca de 10% do total de frascos.

Acresce ainda, a circunstância de que, ao seguir a recomendação do autor, de aguardar até que todos os frascos dêem essa congelação local, chegamos a esperar mais de trinta minutos sem obtê-la e, como consequência da

demora, o líquido se super-resfriava, dando a congelação instantânea, em massa ou irregular, com grumos grandes indesejáveis para os fins de secagem.

Diante da frequência com que se davam essas anormalidades, decidimos investigar as suas possíveis causas, desde que estávamos trabalhando nas condições especificadas por STRUMIA. Deve-se acentuar ainda, que, com plasma normal de cavalo, sempre foram obtidos resultados satisfatórios.

Dirigimos, então, nossas observações para possíveis alterações da composição desses plasmas humanos, do teores de anticoagulante e outras mais que pudessem explicar as discordâncias encontradas.

Inicialmente, averiguamos que o plasma humano, que estávamos estudando, tinha uma maior condutibilidade calorífica do que o de cavalo, que sempre fornece bons resultados. Isto explica a sua maior facilidade de se super-resfriar.

Para conseguir observar esse fenômeno, lançamos mão do recurso de inserir um termômetro num dos frascos, contendo 300 cm³ de plasma, de modo a se fazer a leitura continuada da temperatura interna, enquanto o frasco girava no dispositivo mecânico, mergulhado no álcool resfriado a -35°C. até 1.5 cm de profundidade sómente.

Nos quadros I e II aparecem os resultados conseguidos, partindo de temperaturas ambientes diferentes. O tempo de resfriamento do líquido a +10°C., aí registrado, é contado com o mecanismo giratório em movimento. Essa temperatura é a que STRUMIA indica como sendo a ótima para a paralização do sistema, afim de obter a congelação rápida inicial.

Vê-se que o plasma humano atinge essa temperatura mais rapidamente do que o de cavalo. Atentando-se no desnível existente entre as temperaturas externa e interna, se poderá avaliar a importância de cada minuto de diferença, no sentido de favorecer o super-resfriamento do material e, conseqüentemente, impossibilitar a obtenção da congelação uniforme nas paredes dos continentes.

Na coluna *tempo "snap"*, registra-se o tempo em que o plasma apresenta uma congelação local inicial, mantidos os frascos imóveis.

Pode-se observar claramente que, à exceção de uma vês, nas demais o tempo exigido foi excessivo, sempre que se tratava de plasma humano, e, o que é pior, não se conseguiu congelação nas paredes mas, uma solidificação brusca de quase toda a massa.

Diante desses resultados, fizemos novas observações, agitando os frascos uns dois minutos antes do tempo necessário para o plasma atingir +10°C.,

com o fim de homogenizar a temperatura interna, de vez que poderia haver desigualdade da mesma, motivada pelo grande desnível com a externa.

De fato, como se pode observar no quadro III, os tempos foram menores sempre que as temperaturas iniciais do plasma eram mais elevadas, mas também não foi possível obter resultados satisfatórios na congelação.

Prosseguindo neste sentido, pensamos que, uma vez que o material se estava super-resfriando nessas condições, a interrupção do movimento giratório, quando a temperatura interna fosse de $+14^{\circ}\text{C}$., pudesse permitir melhores resultados. Também, nada de bom foi conseguido.

Idênticas provas foram feitas com o mesmo lote, parando o movimento de rotação dos frascos quando a temperatura chegava a $+14^{\circ}$, $+10^{\circ}$ e $+6^{\circ}\text{C}$.. Nada de satisfatório pode ser conseguido, nessas condições.

Se colocávamos frascos com plasma humano, que não davam a congelação rápida "*snap*", em contato direto com a placa de expansão da unidade refrigeradora, mais fria, portanto, do que o banho de álcool, imediatamente aparecia o fenômeno e tudo prosseguia normalmente.

Neste ponto do trabalho, fixou-se a impressão de que, se o banho fosse um pouco mais resfriado, então seria possível conseguir resultados bons. A técnica de STRUMIA, com banhos a -35°C ., funciona bem com plasmas normais de cavalo mas, com material humano, falhava frequentemente, com prejuízo de tempo e da perfeição do congelamento.

Em face da necessidade de estabelecer um processo que fornecesse resultados constantes, garantindo a realização do trabalho de rotina, sem variações de técnica, decidimos investigar a possibilidade do emprego de um outro artifício que não o proposto por STRUMIA.

Entre as várias idéias experimentadas, como a do uso de vibradores elétricos, etc., uma deu excelentes resultados e vamos descrevê-la, pois, permite congelar o plasma em condições ótimas, usando banhos resfriados a temperaturas superiores a -35°C ., sem qualquer dificuldade e de modo constante.

Trata-se do emprego de pequenas quantidades de gelo seco (neve carbônica), que pode ser obtido facilmente, seja com ajuda de um aparelho de laboratório para esse fim, ou, mesmo, com um saco de feltro à boca do reservatório metálico de gás.

E' a seguinte a técnica que usamos com sucesso, seja qual fôr a qualidade do plasma humano:

Colocam-se os frascos contendo plasma no mecanismo giratório, dentro do banho de álcool a -35°C . e deixa-se que girem por um tempo próximo de

10 minutos, sendo a temperatura do banho -35°C . e a inicial do plasma estando entre $+20^{\circ}$ e $+30^{\circ}$ C. Caso o banho esteja resfriado a temperaturas superiores a -35°C ., torna-se necessário dilatar proporcionalmente o tempo de giro.

Findo esse período, para-se o sistema mecânico de rotação, por 1 a 2 minutos. Movimenta-se o mesmo, a seguir, de modo que as partes mergulhadas, durante essa paralização, fiquem agora voltadas para cima (cerca de $\frac{1}{2}$ minuto), interrompendo-se novamente o movimento de rotação.

Sobre cada frasco e na parte mais resfriada, colocam-se fragmentos de gelo seco: em menos de um minuto todos os frascos apresentam uma congelação local no ponto em que se tocou com a neve carbônica.

Fazendo girar o sistema a seguir, essa congelação local se irradia e a operação prossegue, em uma camada que não ultrapassa 1.5 cm., quando se empregam 300 cm³ do material, em vasos de capacidade de total de 400 cc. O tempo para a congelação total do plasma é de, aproximadamente, uma hora, a contar do momento da colocação do gelo seco.

QUADRO I

Plasma normal de cavalo

<i>Temperatura inicial</i>	<i>Tempo a $+10^{\circ}\text{C}$ minutos</i>	<i>Tempo "SNAP" minutos</i>	<i>Tipo congelação</i>
$+30^{\circ}\text{C}$.	11',0	+ 1',5	Em massa
$+30^{\circ}\text{C}$.	10',5	+11',5	Em massa
$+25^{\circ}\text{C}$.	9',0	+14',0	Em massa
$+25^{\circ}\text{C}$.	8',0	+10',5	Em massa
$+20^{\circ}\text{C}$.	7',0	+11',5	Em massa
$+20^{\circ}\text{C}$.	7',0	+13',5	Em massa

QUADRO II

Plasma humano normal

<i>Temperatura inicial</i>	<i>Tempo a $+10^{\circ}\text{C}$ minutos</i>	<i>Tempo "SNAP" minutos</i>	<i>Tipo congelação</i>
$+30^{\circ}\text{C}$.	8'	4'	Regular
$+25^{\circ}\text{C}$.	8'	13'	Em massa
$+20^{\circ}\text{C}$.	7'	13'	Em massa

QUADRO III

Plasma humano normal (homogenizando 2 minutos antes de atingir +10°C.)

<i>Temperatura inicial</i>	<i>Tempo a +10°C minutos</i>	<i>Tempo "SNAP" minutos</i>	<i>Tipo conge-lação</i>
+30°C.	12'	+2'	Bôa
+25°C.	10'	+1'	Bôa
+20°C.	8'	+1'	Bôa
+20°C.	8'	+2'	Bôa

SUMMARY

A technics for prefreezing of blood plasma and serum is described in this paper.

The method indicated by Strumia et al. (2), uses a rapid local freezing to obtain the shell-freezing, with refrigerated alcohol bath, at temperatures around minus 35°C.

On our work, it has been found that normal horse blood plasma fulfils the instructions given by Strumia, although normal human blood plasma, very often, fails to give the expected results.

This is very disadvantageous at the routine work.

With the use of small amounts of solid carbon dioxide, spread over the flasks, in the refrigerated bath, it has been possible to start the crystallization.

The technics prescribes a rapid cooling, like the one used by Strumia, to bring the temperature down, to about plus 10°C. and, with the rotating device stopped, the solid carbon dioxide is applied for one minute simultaneously on each flask. Starting rotation again, it begins to form a very uniform shell around the walls of the flasks.

BIBLIOGRAFIA

1. FLOSDORF, E. W. e MUDD, S.,
1935. Procedure and apparatus for preservation in "Lyophile" form of serum and other biological substances. J. Immunol., vol. 29, pgs. 389.
2. STRUMIA, M. M. e MC. GRAW, J. J.,
1943. A method and apparatus for shell-freezing and rapid drying of plasma and other products from the frozen state by low temperature water vapor condensation in vacuo. J. Lab. Clin. Med., vol. 28, n.º 9, pgs. 1140-1155.

ERRATA

Pág. 100, linha 31, onde se lê neótipo leia-se lectótipo

Pág. 112, linha 37, onde se lê lectótipo leia-se holótipo

Pág. 112, linha 37, onde se lê alolectótipo leia-se alótipo

Pág. 112, linha 37, onde se lê paralectótipor leia-se parátipos