UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino

Virgilio Tattini Junior

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino

Virgilio Tattini Junior

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

São Paulo
2008

Virgilio Tattini Junior

Etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

**Dedico este trabalho a
minha família**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo, que como cientista, orientador e amigo, tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A Prof. Dra. Duclerc Fernandes Parra pelo apoio e colaboração nas análises térmicas durante a realização da parte experimental do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Guidici pelo valioso auxílio nas análises de espectroscopia Raman.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela constante demonstração de carinho e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares pela constante motivação nestes anos de pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Acima de tudo, a Deus, proporcionando-me força e perseverança ao longo destes anos.

“ Na medida em que a água é tão comumente encontrada e utilizada em diversas situações, os homens se tornaram aptos a imaginar que eles entendem por completo a sua natureza. Porém todos aqueles que cuidadosamente se aplicaram em compreendê-la, depararam-se com um dos assuntos mais difíceis de serem entendidos, dentre as filosofias naturais “.

Herman Boerhave (século XVIII)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO I. Revisão Bibliográfica.....	1
1. A utilização de tecidos biológicos na área médica.....	1
2. Métodos de conservação de materiais biológicos.....	8
3. Metodologias para o controle e aprimoramento do processo de liofilização.....	18
4. Referências.....	30

CAPÍTULO II. Determinação da temperatura de encolhimento do tecido de pericárdio bovino para aplicação como biopróteses de válvulas cardíacas por calorimetria exploratória diferencial e microscopia óptica acoplada a liofilização.....	40
---	----

1. Introdução.....	40
2. Material e Métodos.....	44
3. Resultados e Discussão.....	46
4. Referências.....	50

CAPÍTULO III. A influência do material de confecção do cadinho nas propriedades térmicas de soluções binárias durante as análises de DSC comparadas com os resultados obtidos por microscopia óptica acoplada a liofilização.....	52
---	----

1. Introdução.....	52
2. Material e Métodos.....	56
3. Resultados.....	60

4. Conclusão.....	71
5. Referências.....	72

CAPÍTULO IV. A influência da taxa de congelamento na liofilização do pericárdio bovino.....	74
---	----

1. Introdução.....	74
2. Material e Métodos.....	78
3. Resultados e Discussão.....	82
4. Conclusão.....	93
5. Referências.....	94

PERSPECTIVAS.....	96
-------------------	----

ANEXOS

Materials Research, Vol. 10, No. 1, 1-4, 2007

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry – No prelo

Brazilian Archives of Biology and Technology – No prelo

RESUMO

Em um sistema biológico, a água é responsável por inúmeras reações metabólicas, assim como pela estabilidade estrutural dos constituintes celulares do material. A liofilização é um processo de secagem comumente utilizado para a conservação de materiais biológicos. Entretanto, devido a complexidade do processo e às mudanças térmicas aplicadas ao material, se as etapas da liofilização não forem bem conduzidas, poderão ocorrer danos estruturais irreversíveis. Este projeto tem como objetivo determinar as etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino. Através das técnicas de caracterização térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia óptica acoplada a liofilização (FDM) determinaram-se as principais transições de fases do pericárdio bovino visando o aprimoramento do processo e a qualidade final do produto. Após a liofilização do material, utilizando-se diferentes protocolos de congelamento, concluiu-se que o pericárdio bovino apresenta suporte físico suficiente para ser liofilizado acima da temperatura de transição vítrea sem apresentar sinais de colapso estrutural. O protocolo de liofilização utilizando-se congelamento lento com o emprego do tratamento térmico apresentou os melhores resultados de umidade residual, tempo de liofilização e manutenção da estrutura conformacional do colágeno.

Palavras-chaves: Liofilização, Pericárdio bovino, Tecido biológicos, Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Espectroscopia Raman.

ABSTRACT

In biological system, water is responsible for many metabolic reactions as well as for structural stability of the material cellular constituents. Freeze-drying or lyophilization is a drying technique commonly used for the preservation of biological materials. However, given to the process complexity and to the thermal changes applied to the material, if all freeze-drying steps are not well determined and controlled, irreversible structural damages on the material may occur. The aim of this project is to determine the critical steps on the bovine pericardium tissue freeze-drying. Through two different thermal analysis techniques, Differential Thermal Analysis (DSC) and Freeze-drying microscopy (FDM), it was determined the main phase transitions of bovine pericardium to optimize the freeze-drying process and the quality of dried product. After freeze-drying under different freezing protocols it was concluded that bovine pericardium showed enough physical support to be dried above the glass transition temperature without showing any signs of structural collapse. The freeze-drying protocol using slow freezing rate and annealing showed the best results regarding residual moisture content, freeze-drying time and maintenance of the collagen conformational structure.

Keywords: Freeze-drying, Bovine pericardium, Biological tissues, Differential scanning calorimetry, Raman spectroscopy.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A utilização de tecidos biológicos na área médica

O emprego de próteses confeccionadas a partir de tecidos biológicos vem sendo utilizado desde os anos 60 como uma alternativa para próteses mecânicas (Arcidiacono *et al.*, 2005). Em 1953, Hufnagel implantou as primeiras válvulas cardíacas artificiais em humanos, entretanto, os resultados não foram satisfatórios devido ao pouco domínio do assunto na época. Vários procedimentos de reconstrução cardíaca foram desenvolvidos a partir daquela época, com a intenção de aumentar a biocompatibilidade do material implantado, incluindo a transferência de tecidos sadios de um indivíduo a outro e ainda a fabricação de próteses provenientes de tecidos vivos. Entretanto, apesar do grande avanço na área da tecnologia de implantes, experimentos clínicos revelaram desafios e obstáculos durante a implantação de próteses para o sistema cardiovascular (Schmidt *et al.*, 2000). A partir dos anos 70, válvulas de pericárdio bovino (PB) começaram a ser utilizadas em transplantes. O tecido de PB vem sendo utilizado como material bioprostético alternativo para fabricação de válvulas cardíacas (Cosgrove *et al.*, 1985). Porém, as válvulas cardíacas confeccionadas a partir do PB apresentam problemas específicos quanto à sua estrutura. A falha mecânica é um dos principais fatores da substituição de biopróteses valvulares cardíacas.

Geralmente é causada por falhas estruturais das matrizes de colágeno, em função da reticulação não homogênea do glutaraldeído (GA) de tecidos ricos em colágeno (Woodroff, 1978; Nimni, 1987) e tem como resultante principal a sua calcificação (Tomazic *et al.*, 1994). As complicações relatadas pela incerteza quanto à função e durabilidade das biopróteses valvulares reticuladas com GA preocupam os cirurgiões e cardiologistas quanto à recomendação da troca da válvula, visto que as biopróteses valvulares cardíacas confeccionadas a partir do pericárdio bovino (PB) tratadas convencionalmente têm apresentado taxas de falhas relativamente altas depois de 5 a 7 anos de uso (Lee, 1993; Tomazic *et al.*, 1994).

Atualmente existem dois tipos primários de próteses valvulares cardíacas: biopróteses mecânicas e biopróteses heterólogas (provenientes de tecidos animais). Válvulas cardíacas homólogas (provenientes de seres humanos) conservadas por crioconservação (Nitrogênio líquido) também são utilizadas clinicamente, porém em menor quantidade devido à limitação de doadores (Reardon *et al.*, 1997; Black, 1999). Em se tratando de válvulas mecânicas, vários modelos apresentaram durabilidade por longo período de uso, aproximadamente 25 anos, mas, em geral, os principais problemas apresentados por este tipo de prótese incluem a terapia por longo tempo com anticoagulantes, desordens de sangramento e alterações de fluxo sanguíneo que apresentam diferenças entre as válvulas cardíacas.

As biopróteses valvulares heterólogas consistem em válvulas provenientes de tecidos animais (porco ou boi) modificadas quimicamente a fim de promover a reticulação do tecido colagênico (Yoganathan, 1995; Schoen *et al.*, 1999). Estas válvulas apresentam melhores características hemodinâmicas quando comparadas às válvulas mecânicas e seu uso não necessita de terapia com anticoagulantes por muito tempo. Infelizmente, este tipo de prótese cardíaca não apresenta vida útil satisfatória, aproximadamente de 7 a 10 anos, devido às complicações ocasionadas pela calcificação do tecido implantado (Cohn *et al.*, 1985; Magilligan *et al.*, 1985). A utilização de tecidos homólogos ou heterólogos como parte de biopróteses valvulares cardíacas tem sido fonte de muitos debates na área médica (Hilbert *et al.*, 1988). O uso desses biomateriais necessita, como parte integrante do processo de fabricação de implantes de válvulas cardíacas, do pré-tratamento com agentes químicos com o objetivo de preservar o tecido, aumentar a resistência do material frente às degradações enzimáticas ou químicas, reduzir a imunogenicidade do material implantado e na própria esterilização do material (Black, 1997). Várias técnicas de reticulação desses materiais vêm sendo exploradas com o intuito de encontrar um procedimento ideal para estabilizar a estrutura primária do colágeno enquanto mantém sua integridade mecânica e características naturais.

O agente químico de reticulação mais utilizado na fabricação de válvulas cardíacas é o glutaraldeído, um aldeído bifuncional com cinco carbonos em

sua cadeia, o qual começou a ser empregado na biomedicina no final dos anos 60. O glutaraldeído reage com os aminoácidos pertencentes aos grupos de lisina da estrutura colagênica, induzindo a formação de ligações entre as cadeias de colágeno (Yannas, 1996) e consequentemente, promovendo a estabilidade do tecido contra a degradação química e enzimática (Nimni *et al.*, 1987; Golomb *et al.*, 1996). A reticulação de tecidos ricos em colágeno com GA é largamente utilizada na área cardiovascular (Ionescu *et al.*, 1974; Carpentier *et al.*, 1984), principalmente do PB ou válvulas aórticas porcinas utilizadas na fabricação de biopróteses valvulares. Este tratamento tem como finalidade aumentar a estabilidade mecânica e biológica do material. Contudo, dois fatores impõem importantes restrições à qualidade dos materiais obtidos com o uso do GA: a) a natureza complexa do GA na forma de solução aquosa (Ruijgrok *et al.*, 1994), e b) a reticulação com GA induz ainda a uma impermeabilização superficial nos tecidos colagênicos, impedindo a reação mais homogênea do reagente com o tecido (Woodrof, 1978).

O sucesso do glutaraldeído como agente reticulante e esterilizante se dá em parte devido à sua combinação de características hidrofóbicas e hidrofílicas, permitindo que a molécula penetre rapidamente tanto no meio aquoso quanto nas membranas celulares (Klein *et al.*, 1963). A reticulação com glutaraldeído também mostrou-se eficiente na supressão da resposta imunológica após a implantação do tecido (O'Brien *et al.*, 1984). Entretanto, o tratamento com este agente químico não elimina completamente a resposta

imune de tecidos homólogos ou heterólogos (Heinzerling *et al.*, 1982; Dahm *et al.*, 1990).

Um outro problema apresentado pela reticulação de tecidos com o glutaraldeído é a calcificação do material. Calcificação é a formação de depósitos de cálcio em determinados pontos do tecido resultando na perda da flexibilidade do material. Este efeito adverso delimita a vida útil da prótese no paciente sendo a principal causa para a troca do mesmo (Grabenwoger *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1999). O exato mecanismo da calcificação ainda é desconhecido e o processo vem sendo atribuído a vários fatores: pelo grau de reticulação (Golomb *et al.*, 1987; Nimni *et al.*, 1987), pela presença de grupos aldeídos livres (Grimm *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1991), pela atração de íons de cálcio ao glutaraldeído (Thoma *et al.*, 1995), pela ruptura dos mecanismos regulatórios de cálcio celular ocasionada pelo glutaraldeído levando a formação de núcleos de cálcio no tecido (Schoen *et al.*, 1986), pelas áreas específicas de stress do material (Thubrikar *et al.*, 1983; Thubrikar *et al.*, 1986) e pela presença de lipídeos e detritos celulares (Valente *et al.*, 1985; Courtman, 1994). Muitos mecanismos estão sendo estudados para se investigar a causa real da calcificação com o intuito de minimizá-la ou até mesmo, eliminá-la do tecido implantado.

A utilização de agentes proteoglicanos, como por exemplo, a adição de sulfato de condroitina após a reticulação do tecido com glutaraldeído (Nimni *et al.*, 1987) e a remoção seletiva de lipídeos antes da adição do agente

reticulante (Rossi *et al.*, 1990) também ajudaram na redução da calcificação do tecido. Entretanto, a reticulação com glutaraldeído em se tratando das células e proteínas solúveis no tecido, contribui para a formação de sais de cálcio, como sugerido nos estudos realizados onde esponjas purificadas de colágeno (livres de células) apresentaram calcificação quando tratadas com o agente reticulante e implantadas em ratos (Levy *et al.*, 1986). Recentemente, pesquisadores demonstraram que o pré-tratamento com etanol nas paredes do tecido da aorta e nas válvulas bioprostéticas antes da reticulação com glutaraldeído, foi capaz de reduzir significativamente, porém não por completo, a calcificação (Vyavahare *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998). Tal resultado pode ser explicado pelos seguintes fatores: (1) Uma mudança conformacional irreversível na estrutura do colágeno tipo I; (2) uma diminuição na quantidade de água presente no tecido; (3) um aumento na estabilidade do tecido confirmada pelo aumento da resistência do colágeno ao ataque enzimático e 4) uma remoção quase que completa do colesterol e fosfolípidos do tecido. Todos esses tratamentos citados são capazes de retardar a calcificação do tecido reticulado com glutaraldeído, porém, algumas evidências sugerem que na maioria dos casos o processo de mineralização não é completamente inibido (Neethling *et al.*, 1996). Portanto, vários estudos estão sendo conduzidos com o intuito de descobrir a combinação apropriada de agentes químicos juntamente com a inibição total da calcificação do tecido.

Há um grande interesse no campo do desenvolvimento de biopróteses cardíacas em identificar alternativas para o tratamento dos tecidos a fim de manter as características biológicas do material o mais natural possível e evitar os efeitos indesejáveis provocados pelos agentes químicos reticulantes, geralmente associados com a utilização do glutaraldeído. O poli (glicidil-eter), como por exemplo, o poliepoxi, são compostos químicos que vem sendo investigados em grande extensão como agentes reticulantes de válvulas cardíacas provenientes do pericárdio bovino e suíno (Imamura *et al.*, 1989; Xi *et al.*, 1992; Sung *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1994). Os reagentes de poliepoxi constituem uma família de substâncias químicas que apresentam grande variedade na extensão da cadeia polimérica diversificando sua funcionalidade. Vários compostos de poliepoxi estão sendo utilizados, incluindo o poliglicil-glicerol-éter e o polietilenoglicol-diglicidil-éter. Os compostos de poliepoxi se diferem do glutaraldeído quanto ao mecanismo de formação da reticulação do material: o glutaraldeído reage somente com os amino-grupos dos resíduos da lisina, enquanto que os compostos de poliepoxi reagem preferencialmente com os grupos S-H, carboxilatos, fenolatos e grupos álcoois presentes nos resíduos da proteína (Tu *et al.*, 1993). O tratamento dos tecidos cardiovasculares com o poliepoxi representa um grande esforço para superar os efeitos indesejáveis provocados pelo glutaraldeído, mas não se sabe ao certo ainda, qual a possibilidade de se resolver tais problemas. Por exemplo, em termos de propriedades mecânicas, tecidos e válvulas tratadas com poliepoxi

apresentaram maior flexibilidade quando comparados com tecidos tratados com glutaraldeído (Hata *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1997).

Em termos de citotoxicidade, vários estudos demonstraram que os tecidos tratados com poliepoxi aumentaram a biocompatibilidade do material quando comparados com tecidos reticulados com glutaraldeído, como sugerido pelas observações de bons sinais de recelularização após o implante in-vivo dos tecidos tratados com poliepoxi (Tomizawa *et al.*, 1988; Lohre *et al.*, 1992; Lohre *et al.*, 1993; Uematsu *et al.*, 1998).

2. Métodos de conservação de materiais biológicos

O congelamento de tecidos biológicos é um método de conservação que possui inúmeras aplicações, incluindo a criofixação e a crioconservação. Nos exemplos acima citados, o tamanho, a localização e a quantidade dos cristais de gelo formados nos compartimentos extra e intracelulares do tecido são de grande importância para a manutenção e viabilidade do material (Robards, 1985; Echlin, 1992). A crioconservação é uma das poucas tecnologias disponíveis para o armazenamento de materiais biológicos por um longo período de tempo, fator este, de extrema importância para o fornecimento imediato de órgãos durante eventuais transplantes, como por exemplo, ilhotas pancreáticas (Rajotte, 1994), pele (Aggarwal *et al.*, 1985), artérias (Pegg *et al.*, 1997) e córneas (Taylor, 1986). Atualmente, esta tecnologia está sendo desenvolvida também no campo da engenharia de tecidos biológicos, como

por exemplo, fígado artificial (Borel *et. al.*, 1992) e pele artificial (Applegate *et. al.*, 1998), com o objetivo de assegurar a estabilidade do produto durante seu armazenamento. Entretanto, a crioconservação envolve dois principais problemas: o primeiro é que o material biológico deve ser congelado durante o armazenamento e descongelado durante a sua utilização, ocasionando muitas vezes efeitos indesejáveis nas características morfológicas e histológicas do material. O segundo é o custo de manutenção durante o armazenamento e transporte do material em temperaturas muito baixas (em torno de -90 a -196 °C), que muitas vezes, inviabiliza a técnica de crioconservação de determinados tecidos. Se a taxa de congelamento utilizada for baixa, o sistema celular tentará alcançar o próprio equilíbrio químico através do transporte de água pela membrana semipermeável da célula, até que a concentração de soluto do meio intracelular seja equivalente com a do meio extracelular. Este fenômeno, conhecido como desidratação celular, pode ser facilmente observado através da microscopia óptica. Por outro lado, se a taxa de congelamento utilizada for alta o suficiente, a água irá se tornar cineticamente imobilizada dentro do meio intracelular, criando um estado de fluído intracelular supercongelado. Neste caso, o sistema encontrará equilíbrio através da mudança de estado líquido para sólido do citoplasma celular, conhecido por formação de gelo intracelular. Muitas vezes, o que ocorre durante o congelamento da amostra, é uma competição entre o fenômeno de desidratação celular e a formação de gelo intracelular para se determinar a

proporção final de água (gelo) nos meios intra e extracelulares do tecido biológico (Bischof, 2000). Os pesquisadores geralmente classificam as temperaturas de criogenia para conservação de materiais biológicos basicamente como temperaturas necessárias para a conservação dos materiais biológicos abaixo da temperatura de transição vítrea do material (T_g). A temperatura de transição vítrea caracteriza-se por uma faixa de temperatura específica durante o congelamento da amostra, na qual ocorre a interrupção de todas as atividades biológicas, e geralmente este fenômeno ocorre em temperaturas abaixo dos -30°C para materiais biológicos. Sabe-se que o congelamento de materiais biológicos não é uma técnica adequada e totalmente segura para a conservação, devido às bruscas mudanças no sistema que podem ocorrer durante o resfriamento (queimadura provocada pelo congelamento).

O nitrogênio líquido (N_2) serve não somente como meio refrigerante, mas assim como a água, o N_2 age como veículo para a transmissão de vírus, bactérias, fungos e células. Foutain *et al.* (1997) conduziu um estudo de inspeção de contaminação em fungos e bactérias em tanques de N_2 na conservação de células-tronco hematopoiéticas. Das 583 culturas testadas, 1,2 % do total das amostras demonstraram contaminação por microorganismos. Entretanto, cinco dos seis tanques examinados continham um baixo nível de contaminação microbiana, enquanto que o quinto tanque apresentou um alto grau de contaminação por *Aspergillus*. A contaminação

microbiana presente nos tanques foi similar aos micróbios encontrados nas culturas contaminadas. Outros estudos também demonstraram a ocorrência de contaminação microbiana em células tronco crioconservadas em nitrogênio líquido (N₂) (Lazarus *et al.*, 1991; Prince *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1996).

Um segundo problema observado durante a conservação de materiais biológicos em tanques de N₂ é a falta de homogeneidade na temperatura dentro do tanque. Devido o sistema de abastecimento presente nos tanques, a evaporação do N₂ durante a conservação do material ocasiona um gradiente de temperatura nas amostras que se encontram no nível superior em relação as amostras do nível inferior do tanque. Em grandes tanques de criogenia documentou-se a diferença de temperatura do vapor de N₂ em relação à temperatura de transição vítrea (T_g') da água (-134 °C) alcançando valores bem superiores, como por exemplo, -70 °C (Wolfenbarger, 1998) e -95 °C (Rowley *et al.*, 1992).

No caso de materiais como microorganismos, a preservação será por completa quando ocorrer a interrupção da atividade biológica e das reações de degradação. Estes objetivos podem ser alcançados por técnicas como a liofilização. A utilização da liofilização como método de conservação de materiais biológicos para transplante vem sendo aplicada desde os anos 60. Células, tecidos, embriões, sangue do cordão umbilical, válvulas cardíacas, ossos, são exemplos de materiais biológicos conservados pela liofilização.

Pate e Sawyer (1953) foram os primeiros pesquisadores a conduzir um estudo experimental de válvulas aórticas liofilizadas transplantadas em cães e obtiveram resultados satisfatórios quanto à aceitação do material no hospedeiro e boa resposta mecânica do material transplantado.

A liofilização pode ser definida como um processo de secagem de um produto previamente congelado onde o solvente, geralmente a água, é removida primeiramente por sublimação seguida pela desorção da mesma até atingir níveis de umidade residual satisfatório para impedir o desencadeamento de reações químicas, físicas e biológicas. Aplica-se à remoção de qualquer solvente, mas em biotecnologia, o interesse fundamental se prende à água. O processo de liofilização remove a água de um sistema, baseado no princípio da sublimação do gelo sob pressão reduzida. Quando, por exemplo, uma solução protéica é liofilizada, os cristais de gelo presentes na região intersticial da solução superconcentrada congelada deixará a matriz através da sublimação. As multicamadas da água que envolve a molécula de proteína são então removidas posteriormente por desorção, deixando uma monocamada residual de água na superfície da proteína. Esta operação permite a secagem de materiais termolábeis com o objetivo de diminuir o conteúdo de umidade residual sob condições de temperatura moderadas. Se o produto cujo fim é o uso parenteral, então a proteína é geralmente liofilizada em um recipiente final tal como a ampola de vidro lacrada ou um recipiente de vidro com fecho de borracha, que é usualmente fechado a vácuo ou nitrogênio. O conteúdo de

água do material liofilizado no recipiente final pode variar dependendo dos parâmetros da liofilização, podendo esse, aumentar durante o armazenamento (Townes, 1995).

A liofilização é reconhecidamente o melhor método para produção de produtos desidratados de alta qualidade. Este processo de secagem possui uma série de vantagens que o torna o método preferido para a conservação de materiais biológicos. O material permanece congelado, durante todo o processo, eliminando-se assim a possibilidade de ocorrer o encolhimento e a migração dos constituintes dissolvidos, ou seja, o processo retém a forma original do material. Conduzida de maneira adequada, as reações físico-químicas são inibidas durante o processo, minimizando a perda da atividade biológica ou outra atividade relacionada com a manutenção da estrutura molecular. O produto liofilizado possui uma textura porosa sendo prontamente reconstituído ao seu respectivo tamanho e forma original, quando imerso no solvente de origem.

Por meio da liofilização, tem-se uma interessante demonstração das sutilezas entre as relações da água com os materiais. Sendo um processo de não-equilíbrio, que está sob controle cinético, e envolve estados vítreos meta-estáveis ao invés de equilíbrio termodinâmico de fases (Franks, 1993). Portanto, o entendimento da liofilização está relacionado às questões estruturais, como as transições vítreas, e os fenômenos reológicos (Pitombo, 1989).

A liofilização quando comparada a outros métodos de conservação reduz significativamente a contração do produto, decomposição térmica, reações enzimáticas, desnaturação de proteínas, bem como alterações da morfologia inicial do material.

Um processo de liofilização otimizado pode ser obtido quando os parâmetros (pressão na câmara de secagem e temperatura da prateleira) durante o ciclo forem controlados visando minimizar a perda na qualidade do produto liofilizado (Tambunan *et al.*, 1999).

O principal foco de estudo sob a otimização do processo de liofilização baseia-se na tentativa de reduzir o tempo de secagem enquanto que a qualidade do produto final é mantida (Rambhatla *et al.*, 2003).

A etapa de congelamento durante a liofilização é considerada tão importante quanto a etapa de secagem, devido ao seu efeito potencial sobre o produto, principalmente nas proteínas. Um parâmetro importante que precisa ser definido durante o congelamento é a taxa de resfriamento. Esta por sua vez, pode ser definida como:

$$v = \frac{\partial T(r,t)}{\partial t},$$

onde: v é a taxa de resfriamento, $T(r,t)$ é o campo da temperatura, uma função tanto do tempo, t , como da localização, r .

Assim, a taxa varia temporal e espacialmente. Em geral, um congelamento mais rápido gera pequenos cristais de gelo devido o

supercongelamento da água em temperaturas abaixo de -15°C . De modo oposto, uma taxa de resfriamento mais lenta gera cristais de gelo maiores. O tamanho dos cristais determina o tamanho dos poros a serem criados durante a secagem subsequente. Grandes cristais de gelo criam grandes poros, conduzindo à uma rápida sublimação da água durante a secagem primária, mas a secagem secundária pode ser lenta devido à menor área de superfície formada, limitando a desorção da água durante esta etapa. Para manter um equilíbrio, tem sido recomendado um grau moderado de supercongelamento (10 a 15°C) (Wang, 2000).

O simples congelamento de um material biológico apresenta mudanças físicas muito complexas. O modo de formação e crescimento dos cristais está diretamente relacionado com o grau de supercongelamento da fase líquida, durante a nucleação do gelo. O tamanho final, a distribuição dos cristais de gelo, e, conseqüentemente, a porosidade e textura final do produto liofilizado, são determinados pela taxa de congelamento utilizada. Geralmente os materiais a serem liofilizados são de natureza complexa e apresentam, na maioria das vezes, conteúdo de água superior a 80 %, princípio ativo e excipientes.

O congelamento de um material biológico pode ser diretamente afetado pelo grau de nucleação, que consiste na agregação espontânea das moléculas de água formando um modelo tridimensional onde outras moléculas podem se ligar e finalmente formar um cristal. Assim que a temperatura atinge valores

negativos, a probabilidade da nucleação ocorrer aumenta, devido às forças que induzem à agregação das moléculas de água, e após um determinado ponto, a nucleação diminui em consequência do aumento na viscosidade do produto. A nucleação observada durante a liofilização é amplamente heterogênea (Searles *et al.*, 2001). Em geral, o método de congelamento a ser empregado na liofilização deve ser escolhido cuidadosamente com o objetivo de produzir um grau moderado e uniforme de supercongelamento da água associado ao rápido crescimento dos cristais de gelo.

A distribuição e o diâmetro dos poros do material liofilizado são um reflexo da formação dos cristais de gelo presentes no início da secagem primária. A distribuição e o diâmetro dos cristais de gelo são determinados pelas condições de congelamento do material e pelo tipo de tratamento térmico utilizado nesta etapa (Randolph *et al.*, 2002).

Com o interesse de eliminar a heterogeneidade durante o crescimento dos cristais de gelo, Searles *et al.*, sugeriu a incorporação de um tratamento térmico (*annealing*) durante o processo de congelamento da amostra. Mantendo-se a temperatura da amostra abaixo da temperatura de equilíbrio de congelamento, mas acima da respectiva T_g' do material, por um tempo específico, ocasionou-se a formação de grandes cristais de gelo e a expansão dos pequenos cristais anteriormente formados, favorecendo a uniformidade dos cristais na amostra (Searles *et al.*, 2001). Através da análise de microscopia eletrônica pode-se comparar amostras que sofreram tratamento

térmico com as que foram congeladas sem este tratamento. Os pesquisadores observaram que o tratamento térmico foi capaz de eliminar a heterogeneidade na formação dos cristais de gelo, dando origem a uma secagem primária com tempo reduzido e com fácil reidratação. Pode-se concluir que o tratamento térmico resultou em um ótimo benefício em relação a custo, pelo fato da liofilização apresentar uma redução significativa no tempo de secagem primária quando efetuado um tratamento térmico com menos de trinta minutos de duração acrescido a uma melhor taxa de reidratação, devido à formação de cristais de gelo mais uniformes e com maiores dimensões (Searles *et al.*, 2001). Entretanto, os efeitos prejudiciais do tratamento térmico não podem ser ignorados. A cristalização dos componentes de um sistema tampão em uma amostra pode resultar em mudanças bruscas de pH, incompatibilidade entre polímeros podendo induzir a separação de fases e a degradação protéica por consequência das mudanças na interface soluto / solvente.

Ainda na fase de congelamento durante a liofilização, outro fator de importante caracterização é a determinação da temperatura máxima de sublimação, caracterizada pelo ponto eutético (T_{eut}), característica específica de materiais que apresentam cristalização total, como por exemplo, solução de cloreto de sódio (NaCl) ou ainda, mais comumente encontrado, pela transição vítrea do material congelado (T_g').

Durante o processo de liofilização, a temperatura do produto não deverá ultrapassar a T_{eut} ou a T_g' , caso contrário, a água presente no material

apresentará viscosidade suficiente para levar ao desencadeamento de reações físicas, químicas, biológicas e estruturais.

Sob temperaturas abaixo da T_g' , a matriz do soluto assemelha-se à um vidro, comportando-se como um sólido amorfo. Em uma liofilização, se a temperatura de congelamento ultrapassar a T_g' , a solução amorfa concentrada ficará menos viscosa, ocorrendo o colapso do produto. Durante a liofilização, a concentração do soluto da matriz aumenta progressivamente devido à perda de água. A matriz torna-se mais rígida e a T_g' aumenta. O produto pode então tolerar o aumento da temperatura sem sofrer o colapso (Chen *et al.*, 1995). A T_g é uma transição de segunda ordem e é caracterizada por uma interrupção na relação entre temperatura e capacidade calorífica.

3. Metodologias para o controle e aprimoramento do processo de liofilização

Para a precisa determinação dos parâmetros acima citados, técnicas como calorimetria exploratória diferencial (DSC) e ainda mais recente, a microscopia óptica acoplada à liofilização (FDM) vêm sendo utilizadas por inúmeros pesquisadores.

A técnica de DSC é um método termo-analítico capaz de medir, caracterizar e analisar as propriedades térmicas dos materiais e determinar a capacidade calorífica, entalpias de fusão e transições de fases (Mi, 2002).

Através desta técnica pode-se medir a diferença de energia fornecida entre a substância em estudo e um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura. Os resultados obtidos pela técnica de DSC são representados em forma de gráfico: fluxo de calor (mW) por temperatura ($^{\circ}\text{C}$) ou tempo (min). Tanto o T_{eut} , assim como, a temperatura de fusão dos cristais de gelo presentes no material congelado e a temperatura de cristalização são observados como picos endotérmicos ou exotérmicos (dependendo do evento) bem definidos. Já a T_g' apresenta-se como uma descontinuidade na linha base do gráfico, como sendo uma faixa de temperatura, compreendendo a T_g' inicial (início do evento), T_g' ponto médio (fase crítica do evento) e a T_g' final (término do evento). Neste estudo, a T_g' do PB será caracterizada pela T_g' ponto médio.

A técnica de FDM baseia-se na observação microscópica do material durante sua liofilização. Através dela podemos confirmar com maior exatidão, os resultados obtidos por DSC. A FDM é capaz de determinar a temperatura de cristalização da água presente no material (T_{crist}), T_{eut} , a temperatura de colapso (T_c) e a temperatura de fusão dos cristais de gelo (T_m). A T_c ocorre na interface de sublimação, quando o gelo dendrítico é sublimado a uma temperatura acima da T_c . A solução concentrada não tem viscosidade suficiente para suportar sua própria estrutura, sem o suporte adicional do gelo puro que havia sido previamente imobilizado. Quando o gelo puro é sublimado,

o líquido viscoso flui para dentro das cavidades da interface ocorrendo o colapso. Em seguida, devido à presença de água no estado líquido, ocorre a expansão da matriz. Isto deixa uma camada que normalmente atua como uma barreira, reduzindo a taxa de sublimação. O produto ganha calor sensível, promovendo uma reação em cadeia.

A técnica se dá colocando-se uma pequena amostra do produto em uma câmara sob o microscópio, que age como um micro liofilizador. A amostra é então congelada a uma temperatura pré-selecionada e a pressão da câmara é reduzida a um determinado valor (geralmente 100 mTorr) para começar o processo de secagem. A temperatura desta fase pode então ser manipulada com a finalidade de identificar o grau de temperatura em que ocorrerá o colapso ou a fusão do material. Este processo pode ser visto no microscópio, ou no computador usando a câmera de captura de imagem no programa fornecido com o sistema. O software permite que o usuário controle através da tela do computador, o processo de liofilização em tempo real com imagens de todas as fases, desde a formação dos primeiros cristais de gelo, a conformação da matriz liofilizada, além do tamanho dos poros formados após a sublimação do gelo. Estes parâmetros citados são imprescindíveis na otimização do processo de liofilização e no estudo da reconstituição do material.

A T_c específica do material vêm sendo constantemente comparada com a T_g' por inúmeros pesquisadores. Geralmente observa-se uma diferença entre

1 e 2 °C entre ambas, porém, dependendo da metodologia utilizada durante o experimento e do tipo de material, diferenças de até 5°C podem ser constatadas. Valores de T_g obtidos por DSC foram relacionados a valores da temperatura de colapso (T_c), medidos por criomicroscopia (Chang *et. al.*, 1992, Ross, 1993). Chang e Randall (1992) observaram uma estreita relação entre a T_g e o fenômeno do colapso. Entretanto, Pikal e Shah (1990) sustentaram que a diferença entre T_g e T_c é sutil mas possivelmente importante. Eles relataram que a T_g é ligeiramente menor que a T_c quando medida sob baixas taxas de aquecimento. Mais tarde, Pikal concordou que a T_g e a T_c são idênticas para a maioria dos propósitos práticos.

O material de acondicionamento da amostra durante a análise de DSC, denominado “cadinho”, pode ter grande influência na qualidade dos resultados obtidos. Os cadinhos mais comumente utilizados são os de alumínio ou em algumas vezes, o de cobre. Durante a análise térmica de DSC, o formato e o calor específico do material que constitui o cadinho podem influenciar as especificações de medida do sistema de DSC, como por exemplo, a sensibilidade calorífica e o sinal de equilíbrio térmico durante uma isoterma. Os cadinhos que apresentam uma base regular, homogênea e com bom contato com os sensores do equipamento de DSC, conseqüentemente apresentarão ótima transferência de calor e energia com o mínimo de gradiente de temperatura entre a amostra e a referência (cadinho vazio). O material de confecção do cadinho deve ser inerte, ou seja, não deverá reagir com a

amostra durante o programa de temperatura selecionado na análise. Ainda, o cadinho não deverá apresentar nenhuma transição de fase durante o programa de temperatura selecionado e, principalmente, a temperatura de fusão do cadinho deverá ser alta suficiente para evitar danos ao equipamento durante programas de aquecimento da amostra à altas temperaturas.

Geralmente, durante a liofilização, as soluções farmacêuticas são acondicionadas em frascos de vidro tipo I (borosilicato), por apresentarem ótima compatibilidade física e química com a maioria dos fármacos e também pelo baixo custo comparado com os demais materiais de acondicionamento. Os materiais biológicos sólidos ou semi-sólidos são comumente acondicionados diretamente nas prateleiras dos liofilizadores, e por sua vez, são fabricados em alumínio ou aço inox 314 ou 316L. Este último é o mais aceito pelas entidades regulatórias como a agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) e a Agência Nacional de Vigilância e Inspeção Sanitária (ANVISA), pois apresentam características específicas que garantem a esterilidade do processo. Entretanto, durante o estudo de caracterização térmica do material a ser liofilizado, as amostras são acondicionadas em cadinhos de alumínio e submetidas a um programa de temperatura para detectar as transições de fases ocorridas durante o congelamento e aquecimento do material. Qual seria a influência do material em que o cadinho é confeccionado, nas transições de fases durante o estudo de caracterização térmica do produto?

Durante os ciclos de liofilização existem determinados parâmetros de processo que podem ser mantidos fixos a níveis pré-determinados. Sob condições normais de operação, a temperatura do fluído que circula nas prateleiras do liofilizador e o tempo das rampas e dos patamares não são afetados, tornando-os variáveis independentes.

Entretanto, através de parâmetros operacionais programáveis, existem variáveis dependentes que não podem ser pré-determinadas durante o processo de liofilização devido à relação que tais parâmetros estão interligados com as variáveis de processo. Podemos citar como exemplo, a temperatura do condensador. Durante a secagem primária, esta temperatura atinge o equilíbrio em diferentes níveis, dependendo da quantidade de água a ser sublimada. Assim como a temperatura do condensador temos ainda a pressão da câmara, a temperatura do produto, o tempo de secagem do material, entre outras variáveis dependentes. Durante a liofilização, a secagem é dividida em duas fases: secagem primária e secundária. Na secagem primária os cristais de gelo são removidos por sublimação, enquanto que na secagem secundária ocorre a eliminação da água por desorção. Ao final da secagem primária, o conteúdo de umidade residual está em torno de 10 a 15 %, e ao final da secagem secundária este conteúdo chega a níveis abaixo de 3 %. A principal força de remoção da água por sublimação durante a liofilização se dá pelo gradiente de temperatura entre o produto e o condensador (Mi, 2002).

O propósito básico em desenvolver um processo de liofilização otimizado está na capacidade deste tipo de estudo fornecer dados e evidências com um alto grau de reprodutibilidade e confiança com o objetivo de atingir especificações pré-determinadas para o produto final, através da análise dos parâmetros utilizados durante o processo de liofilização associada às características do produto liofilizado (Bindschaedler, 1999).

A estrutura básica das válvulas cardíacas provenientes do PB é composta basicamente por fibras de colágeno. A estrutura dessas fibras e a água que envolve a rede de colágeno apresentam papel fundamental na resistência mecânica do material e vem sendo caracterizada por inúmeras técnicas (Bella *et al.*, 1994; Renou *et al.*, 1994).

A água quando associada à estrutura do colágeno pode ser dividida em 3 tipos: estrutural, ligada e livre (excesso). A água estrutural é responsável por estabilizar a conformação de tripla-hélice através da participação nas ligações de hidrogênio com a estrutura helicoidal do colágeno. O segundo tipo de interação caracteriza-se pela interação entre as pontes de hidrogênio com as estruturas microfibrilares do colágeno. O terceiro tipo de interação consiste na ligação entre a água livre do sistema com os sistemas microfibrilares e fibrilas (Jastrzebska *et al.* 2003).

Estudos recentes na determinação da temperatura de desnaturação de materiais biológicos compostos por colágeno, observaram um dramático encolhimento das fibras (>80%) em comprimento quando o material é

submetido à um programa de temperatura controlada. Este efeito é resultado da desnaturação da estrutura de tropocolágeno presente no material devido ao aquecimento induzido (Flory e Garrett, 1958).

Esta temperatura específica de desnaturação das estruturas de colágeno ficou denominada como “temperatura de encolhimento”, um termo aplicado apenas aos materiais que apresentam colágeno na estrutura do material, independente do método para determinação deste fenômeno.

Vários artigos foram publicados na última década sobre a utilização da técnica de DSC para a determinação da temperatura de encolhimento de materiais biológicos compostos por colágeno (Fortune *et al.*, 1984; Fisher *et al.*, 1987; Bigi *et al.*, 1987; Ignatieva *et al.*, 2004; Siapi *et al.*, 2005).

Apesar da liofilização ser um processo muito sutil para a retirada da água do material, o processo pode causar diversas mudanças potenciais no espectro infravermelho (IR) de materiais protéicos. A perda das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e as cadeias protéicas durante a liofilização, geralmente leva a um aumento da frequência e uma diminuição da intensidade das faixas de expansão da hidroxila. O desdobramento das proteínas durante a liofilização amplia e modifica (para números de ondas maiores) os picos dos componentes da Amida I. A espectroscopia Raman tem sido utilizada para caracterizar a estrutura secundária de proteínas e para estudos das alterações induzidas na conformação protéica. A técnica já foi utilizada com sucesso na determinação de conformações de inúmeros

materiais biológicos, como por exemplo, enzimas e cadeias de DNA, interações e reações entre moléculas e estruturas enzimáticas (Spiro, 1987; Twardowski *et al.*, 1994), na determinação do conteúdo total de água em culturas de córneas humanas (Siew *et al.*, 1995) e também, na caracterização das lentes oculares e sua transformação em tecido específico na diagnose de cataratas (Uizinga *et al.*, 1989). O pericárdio bovino (PB) é composto principalmente de colágeno tipo I (Naimark *et al.*, 1992).

A espectroscopia Raman é uma ferramenta muito poderosa por estudar a estrutura e interações moleculares complexas. Este método foi usado com sucesso para estudar o mecanismo de reticulação do GA-colágeno. Um das maiores vantagens desta técnica é sua capacidade em prover informações sobre a estrutura e interações de biomoléculas em seu microambiente dentro das células e tecidos. A técnica não é destrutiva e não requer homogeneização, extração ou o uso de corantes, rótulos ou outros agentes de contraste. Por se tratar de uma técnica vibracional, a espectroscopia Raman é mais vantajosa que espectroscopia de infravermelho (IR), como por exemplo, a observação das propriedades estruturais de moléculas em solução aquosa pode ser observada mais facilmente (Jastrzebska *et al.*, 2003).

O espectro Raman normal de uma proteína consiste das contribuições dos modos vibracionais de várias cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos juntamente com os modos do esqueleto peptídico. Estes modos

vibracionais fornecem informações estruturais, como conformação média do esqueleto polipeptídico, a microvizinhança de algumas cadeias laterais (particularmente aquelas da tirosina, do triptofano e da metionina) e a conformação das pontes dissulfetos existentes na proteína (Stuart, 1997).

A espectroscopia por infravermelho tem sido utilizada para quantificar a estrutura secundária das proteínas e para estudos das alterações induzidas na conformação destas. A informação estrutural é obtida pela análise da faixa na região da Amida I conformacionalmente sensível que situa-se entre 1.600 e 1.700 cm^{-1} . Esta banda é sensível ao estiramento vibracional das ligações C=O, fracamente ligadas ao estiramento C-N e N-H. Cada tipo de estrutura secundária (α -hélice, folhas- β e estruturas desordenadas) causa o aumento de uma frequência de estiramento de C=O diferente e, portanto, apresenta uma posição de faixa característica, que é designada pelo número da onda em cm^{-1} . As posições das faixas são utilizadas para determinar os tipos estruturais secundários presentes em uma proteína. As áreas de faixa relativa podem então ser utilizadas para quantificar cada componente estrutural. Conseqüentemente, uma análise das faixas por espectroscopia infravermelho na região da Amida I pode fornecer informação tanto quantitativa, como qualitativa sobre a estrutura secundária da proteína.

Para obter essa informação estrutural detalhada é necessário aumentar a resolução da faixa de Amida I da proteína, que geralmente aparece como um único e amplo contorno de absorbância.

Para os estudos de alterações estruturais induzidas pela liofilização recomenda-se o cálculo do segundo espectro derivativo. Este método é muito objetivo e as alterações nas larguras das faixas componentes são devidas ao desdobramento da proteína que são preservadas no segundo espectro derivativo (Carpenter *et al.*, 1999).

O estado de hidratação apresenta um papel importante nas propriedades mecânicas e imunogênicas de tecidos biológicos (Jastrzebska *et al.*, 2003). A quantidade de água presente no material tem um significativo impacto na estabilidade tornando-se preocupante, tanto para o volume do sólido, como para as formulações liofilizadas. A umidade residual refere-se ao baixo nível de água superficial, variando a partir de menos de 1% até 5%, permanecendo no produto biológico liofilizado após a remoção do volume de água. A umidade residual não deveria comprometer a potência, no caso de soluções farmacêuticas e a integridade do produto final. O nível apropriado de umidade residual para otimizar a estabilidade de uma proteína liofilizada é muito dependente dos caminhos específicos para a decomposição desta. A visão geralmente aceita é quanto mais seco melhor. Porém, os níveis de umidade residual de certos produtos não deveriam ser tão baixos a ponto do excesso de secagem afetar adversamente a estabilidade do produto. A retenção de água é variável de acordo com o tipo de água presente, tipo de ligação, superfície e/ou água retida presente no produto. Como podem existir mais de um tipo de água em um produto biológico liofilizado, podem ser

encontrados diferentes resultados de umidade quando são empregados diferentes métodos na determinação do conteúdo de umidade da amostra (Towns, 1995).

O conteúdo de umidade residual após a liofilização freqüentemente controla a estabilidade da proteína por um longo período, tanto física como quimicamente. O conteúdo de umidade de um produto liofilizado pode mudar significativamente durante o armazenamento, devido os vários fatores, tais como: 1) a liberação de umidade pelo material de acondicionamento e entrada de ar para o interior da embalagem contendo o produto liofilizado; 2) a cristalização de um excipiente amorfo; ou 3) a liberação de umidade de um excipiente hidratado. A água pode afetar a estabilidade da proteína tanto indiretamente (agindo como um plasticizante ou como meio de reação), como diretamente (como um reagente ou um produto de reação) (Wang, 2000).

Indiretamente como um plasticizante, a água diminui drasticamente a temperatura de transição vítrea das proteínas, polímeros ou excipientes da formulação. O efeito quantitativo da água na temperatura de transição vítrea pode ser facilmente estimado pela equação de Gordon–Taylor. A queda da T_g pela água pode atingir 10° ou mais, para cada percentagem de umidade retida, especialmente em conteúdos com baixo nível de umidade. Além disso, uma proteína liofilizada pode absorver facilmente quantidades suficientes de umidade durante o armazenamento para reduzir sua T_g abaixo da temperatura de armazenamento acelerar sua instabilidade e causar um possível colapso do

produto. Por exemplo, a dimerização da insulina liofilizada aumenta significativamente quando o conteúdo de água é alto o suficiente para causar a diminuição significativa da temperatura de transição vítrea e o colapso do sólido. O alto conteúdo de umidade também facilita a cristalização dos excipientes da fórmula, tais como os açúcares (Wang, 2000).

Considerando o exposto acima, o objetivo deste trabalho é determinar as etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino.

4. REFERÊNCIAS

SCHMIDT, C.E.; BAIER, J.M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomat.*, v.21, p.2215-2231, 2000.

AGGARWAL, S.J.; BAXTER, C.R.; DILLER, K.R. Cryopreservation of skin: an assessment of current clinical applicability. *J. Burn Care Rehabil.*, v.6, p.469-76, 1985.

APPLEGATE, D.R.; KIM, J. Cryopreservation process scaleup for a tissue-engineered, metabolically active, human dermal replacement, dermagraft. *Cryobiology*, v.37, p.409-410, 1998.

ARCIDIACONO, G., CORVI, A; SEVERI, T. Functional analysis of bioprosthetic heart valves. *J. Biomech.*, v.38, n.7, p.1483-90, 2005.

BELLA, J.; BRODSKY, B.; BERMAN, H.M. Crystal-structure and molecular-structure of a collagen-like peptide at 1.9-Angstrom resolution. *Sci.*, v.266, p.75-81, 1994.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; ROVERI, N.; KOCH, M.H.J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 9, p.363-367, 1987.

BINDSHEDLER, C. Lyophilization process validation. In: Freezing-Drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products, edited by Louis Rey, 1999.

BISCHOF, J. C. Quantitative measurement and prediction of biophysical response during freezing in tissues. *Ann. Rev. Biom. Eng.*, v.2, p.257-288, 2000.

BLACK K. Successful trans-species implant of a tissue engineered heart valve. First International Symposium, Tissue Engineering for Heart Valve Bioprostheses, London, England, 1999.

BOREL, R.I.; TONER, M.; SHEEHA, S.J.; TOMPKINS, R.G.; YARMUSH, M.L. Long-term functional recovery of hepatocytes after cryopreservation in a three-dimensional culture configuration. *Cell Transplant.*, v.1, p.281-292, 1992.

CARPENTER, J. F.; IZUTSU, K.; RANDOLPH, T. W. Freezing and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives, *Freezing-Drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, edited by Louis Rey, 1999.

CARPENTIER, A.; NASHEF, A.; CARPENTIER, A.; AHMED, A.; GOUSSEF, N. Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses. *Circulation*, v. 70, p.165-68, 1984.

CHANG, B.S.; RANDALL, C. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization, *Cryobiol.*, v. 29, p. 632-638, 1992.

CHEN, T.; OAKLEY, D.M. Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest. *Thermoch. Acta*, v.248, p. 229-244, 1995.

COHN, L.H.; ALLRED, E.N.; COHN, L.A. Early and late risk of mitral valve replacement. A 12 year concomitant comparison of the porcine bioprosthetic and prosthetic disc mitral valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.90, p.872-881, 1985.

COSGROVE, D.M.; LYTLE, B.W.; GILL, C.C. In vivo hemodynamic comparison of porcine and pericardial valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 89, p.358-68. 1985.

COURTMAN, D.W.; PEREIRA, C.A.; KASHEF, V.; MCCOMB, D.; LEE, J.M.; WILSON, G.J. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.28, p.655-666. 1994.

DAHLM, M.; LYMAN, W.D.; SCHWELL, A.B.; FACTOR, S.M.; FRATER, R.W. Immunogenicity of glutaraldehyde-tanned bovine pericardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.99, p.1082-1090, 1990.

ECHLIN, P. *Low-Temperature Microscopy and Analysis*. New York: Plenum, v. 539, p. 2, 1992.

FISHER, J.; GORHAM, S.D.; HOWIE, A.M.; WHEATLEY, D.J. Examination of fixative penetration in glutaraldehydetreated bovine pericardium by stratigraphic analysis of shrinkage temperature measurements using differential scanning calorimetry. *Life Supp. Syst.*, v.5, p.189-193, 1987.

FLORY, P.J.; GARRETT, R.R. Phase transitions in collagen and gelatin systems, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 1, p.80, 1958.

FORTUNE, F.; CHANTAL, B.; DANIEL, H. A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. *Biochim. Biophys. Acta*, v.791, p.205-211, 1984.

FOUNTAIN, D.; RALSTON, M.; HIGGINS, N.; GORLIN, J.; UHL, L.; WHEELER, C.; ANTIN, J.; CHURCHILL, W.; BENJAMIN, R. Liquid nitrogen freezers: A potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*, v.37, p.585-591, 1997.

FRANKS, F. Solid aqueous solutions, *Pure Appl. Chem.*, v.65, p.2527-2537, 1993.

GOLOMB, G.; SCHOEN, F.J.; SMITH, M.S.; LINDEN, J.; DIXON, M.; LEVY, R.J. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am. J. Pathol.*, v.127, p.122-130, 1987.

GONG, G.; LING, Z.; SEIFTER, E.; FACTOR, S.M.; FRATER, R.W. Aldehyde tanning: the villain in bioprosthetic calcification. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* v.5, p.288-299, 2003.

GRABENWOGER, M.; SIDER, J.; FITZAL, F. Impact of glutaraldehyde on calcification of pericardial bioprosthetic heart valve material. *Ann. Thorac. Surg.*, v.62, p.772-777, 1996.

GRIMM, M.; EYBL, E.; GRABENWOGER, M. Biocompatibility of aldehyde-fixed bovine pericardium. An in vitro and in vivo approach toward improvement of

bioprosthetic heart valves. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., v.102, p.195-201, 1991.

HATA, C.; WANG, E.; NOISHIKI, Y. Evaluation of a polyepoxy compound fixed biological vascular prosthesis and an expanded polytetrafluoroethylene vascular graft. Artif. Organs, v.16, p.263-266, 1992.

HEINZERLING, R.H.; STEIN, P.D.; RIDDLE, J.M.; MAGILLIGAN JR., D.J.; JENNINGS, J.J. Immunological involvement in porcine bioprosthetic valve degeneration: preliminary studies. Henry Ford Hosp. Med.J., v.30, p.1465-1471. 1982.

HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J.; JONES, M. Tissue-derived biomaterials and their use in cardiovascular prosthetic devices. Med. Prog. Technol., v.14, p.115-163, 1988.

HUIZINGA, A.; BOT, A.C.; DE MUL, F.F.; VRENSSEN, G.F.; GREVE, J. Local variations in absolute water content of human and rabbit eye lenses measured by Raman microspectroscopy. Exp. Eye Res., v.48, p.487-496, 1989.

IGNATIEVA, N.Y.; LUNIN, V.V.; AVERKIEV, S.V.; MAIOROVA, A.F.; BAGRATASHVILI, V.N.; SOBOL, E.N. DSC investigation of connective tissues treated by IR-laser radiation. Thermoch. Acta, v.442, p.43-48, 2004.

IMAMURA, E.; SAWATANI, O.; KOYANAGI, H.; NOISHIKI, Y.; MIYATA, T. Epoxy compounds as a new cross-linking agent for porcine aortic leaflets: subcutaneous implant studies in rats. J. Cardiovasc. Surg., v.4, p.50-57, 1989.

IONESCU, M.I.; PAHRASHI, B.C.; MARY, D.A.S.; BARTEK, I.T.; WOOLER, G.H. Long-term evaluation of tissue valves. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., v. 68, p. 361-79, 1974.

JASTRZEBSKA, M.; WRZALIK, R.; KOCOT, A.; ZALEWSKA-REJDAK, J.; CWALINA, B. Hydration of glutaraldehyde-fixed pericardium tissue: Raman spectroscopic study. J. Raman Spectrosc., v.34, p.424-431, 2003.

KLEIN, M.; DEFOREST, A. The inactivation of viruses by germicides. Chem. Spec. Manuf. Proc., v.49, p.116-118, 1963.

LAZARUS, H.; MAGALHAES-SILVERMAN, M.; FOX, R.; CREGER, R.; JACOBS, M. Contamination during in vitro processing of bone marrow for transplantation: Clinical Significance. Bone Marrow Transplant, v.7, p.241-246, 1991.

LEE, Y.S. Morphogenesis of calcification in porcine bioprosthesis: insight from high-resolution electron microscopic investigation at molecular and atomic resolution. *J. Electron Microsc.*, v. 42, p. 156-65, 1993.

LEE, C.H.; VYAVAHARE, N.R.; ZAND, R. Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.42, p.30-37, 1998.

LEVY, R.J.; SCHOEN, F.J.; SHERMAN, F.S.; NICHOLS, J.; HAWLEY, M.A.; LUND, A. Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponges. Effects of formaldehyde and glutaraldehyde pretreatments, *Med. J. Pathol.*, v.122, p.71-82, 1986.

LOHRE, J.M.; BACLIG, L.; SAGARTZ, J.; GUIDA, S.; THYAGARAJAN, K.; TU, R. Evaluation of two epoxy ether compounds for biocompatible potential. *Artif. Organs*, v.16, p.630-633, 1992.

LOHRE, J.M.; BACLIG, L.; WICKHAM, E. Evaluation of epoxy ether fixed bovine arterial grafts for mutagenic potential. *ASAIO J.*, v.39, p.106-113, 1993.

MAGILLIGAN JR., D.J.; LEWIS JR., J.W.; TILLEY, B.; PETERSON, E. The porcine bioprosthetic valve: Twelve years later. *J. Torca. Cardiovasc. Surg.*, v.89, p.499-507, 1985.

MI, Y. Protection mechanisms of excipients on lactate dehydrogenase during freeze-thawing and lyophilization. A Dissertation Presented to The Graduate Studies Council, The University of Tennessee Health Science Center, December, 2002.

NAIMARK, W. A.; LEE, J. M.; LIMBACK, H.; CHEUNG, D. T. Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species. *Am. J. Phys.*, v.262, p.1095-1106, 1992.

NEETHLING, W.M.; SMITH, F.E.; VAN DEN HEEVER, J.J.; DUYVENE DE WIT, L.J.; HOUGH J. Laboratory evaluation of tissue heart valves. A comparative assessment, *J. Cardiovasc. Surg.*, v.37, p.377-383, 1996.

NIMNI, M. E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 21, p.741-771, 1987.

NIMNI, M.E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.21, p.741-771, 1987.

O'BRIEN, T.K.; GABBAY, S.; PARKES, A.C.; KNIGHT, R.A.; ZALESKY, P.J. Immunological reactivity to a new glutaraldehyde tanned bovine pericardial heart valve. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, v.30, p.440-444, 1984.

PATE, J.W.; SAWYER, P.N. Freeze-dried aortic grafts. *Am. J. Surg.*, v.86, p.3-13, 1953.

PEGG, D.E.; WUSTEMAN, M.C.; BOYLAN, S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology*, v.34, p.183-192, 1997.

PIKAL, M.J.; SHAH, S. The collapse temperature in freeze-drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy state. *Int. J. Pharm.*, v.62, p.165-186, 1990.

PITOMBO, R. N. M. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 427-431, 1989.

PRINCE, H.; PAGE, S.; KEATING, A.; SARAGOSA, R.; YUKOVIC, N.; IMRIE, K.; CRUMP, M.; STEWART, A. Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant*, v.15, p.87-91, 1995.

RAJOTTE, R.V. Cryopreservation of pancreatic islets. *Transplant. Proc.*, v.26, p.395-396, 1994.

RAMBHATLA, S.; PIKAL, M.J. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze-drying, I: atypical radiation and the edge vial effect. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, v.4, n.2, p. 1256-1264, 2003.

RANDOLPH, T.W.; SEARLES, J.A. Freezing and annealing phenomena in lyophilization: effects upon primary drying rate, morphology and heterogeneity. *Am. Pharm. Rev.*, v.5, n.4, p. 40 - 46, 2002.

RAO, K.P.; SHANTHI, C. Reduction of calcification by various treatments in cardiac valves. *Biomater. Appl.*, v.13, p.238-268, 1999.

RATNER B.D., HOLMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E.; YANNAS, I.V. *Natural materials*. Ed. *Biomat. Sci.*, San Diego, Academic Press, p. 84-94, 1996.

REARDON, M.J.; O'BRIEN, M.F. Allograft valves for aortic and mitral valve replacement. *Curr. Opin. Cardiol.*, v.12, p.114-122, 1997.

RENOU, J.P.; BONNET, M.; BIELICKI, G.; ROCHDI, A.; GATELLIER, P. NMR study of collagen water interactions. *Biopolymers*, v.34, p.1615-1619, 1994.

ROBARDS, A.W.; SLEYTR, U.B. *Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy*. Oxford, UK, Elsevier, p. 551, 1985.

ROSS, Y. Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates. *Carb. Res.*, v.238, p.39-47, 1993.

ROSSI, M.A.; BRAILE, D.M.; TEIXEIRA, M.D.; SOUZA, D.R.; PERES, L.C. Lipid extraction attenuates the calcification degeneration of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *J. Exp. Pathol.*, v.71, p.187-196, 1990.

ROWLEY, S.; BYRNE, D. Low-temperature storage of bone marrow in nitrogen vapor-phase refrigerators: Decreased temperature gradients with an aluminum racking system. *Transfusion*, v.32, p.750-754, 1992.

RUIJGROK, J.M.; DE WIGN, J.R.; BOON, M.E. Optimizing of glutaraldehyde crosslinking of collagen: effects of time, temperature and concentration as measured by shrinkage temperature. *J. Mat. Sc. Mat. Med.*, v. 5, p. 80-7, 1994.

SCHOEN, F.J.; LEVY, R.J. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed.Mater. Res.*, v.47, p.439-465, 1999.

SCHOEN, F.J.; TSAO, J.W.; LEVY, R.J. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *Am. J. Pathol.*, v.123, p.134-145, 1986.

SEARLES J.A.; CARPENTER J.F.; RANDOLPH, T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine Tg in pharmaceutical lyophilization. *J. Pharm. Sci.*, v.90, n.7, p.872-887, 2001.

SHEN, S.H.; SUNG, H.W.; TU, R. Characterization of a polyepoxy compound fixed porcine heart valve bioprosthesis. *J. Appl. Biomater.*, v.5, p.159-162, 1994.

SIAPI, E.; MAVROMOUSTAKOS, T.; TRANDAFIR, V.; ALBU, B.; BUDRUGEAC, P. The use of differential scanning calorimetry to study the effects of gentamycin on fibrous collagenous membranes. *Thermoch. Acta*, v.425, p.165-171, 2005.

SIEW, D.; CLOVER, G.; COONEY, R.; WIGGINS, P. Micro-Raman spectroscopic study of organ cultured corneae. *J. Raman Spectrosc.*, v.26, p.3-8, 1995.

SPIRO, T. J. Raman spectra on the conformations of biological macromolecules. In: *Biological Application of Raman Spectroscopy*, v.1, John Wiley and Sons, New York, p.81-133, 1987.

STUART, B. Biological applications of infrared spectroscopy, *Analytical Chemistry by Open Learning*, 1997.

SUNG, H.W.; SHEN, S.H.; TU, R. Comparison of the cross-linking characteristics of porcine heart valves fixed with glutaraldehyde or epoxy compounds. *ASAIO J.*, v.39, p. 532-540, 1993.

SUNG, H.W.; WITZEL, T.H.; HATA, C. Development and evaluation of a pliable biological valved conduit. Part II: functional and hemodynamic evaluation. *Int. J. Artif. Organs*, v.16, p.199-204, 1993.

TAMBUNAN, A.H.; WENUR, F.; YUDISTIRA, A.. Transport properties and heating performance in freeze drying process. *Proceedings of The First Asian Australian Drying Conference*, Bali, Indonesia, p. 525-534, 1999.

TAYLOR, M.J. Clinical cryobiology of tissues: preservation of corneas. *Cryobiology*, v.23, p.323-353, 1986.

THOMAS, R.J.; PHILLIPS, R.E. The role of material surface chemistry in implant device calcification: a hypothesis. *J. Heart Valve Dis.*, v.4, p.214-221, 1995.

THUBRIKAR, M.J.; AOUAD, J.; NOLAN, S.P. Patterns of calcification deposits in operatively excised stenotic or purely regurgitant aortic valves and their relation to mechanical stress. *Am. J. Cardiol.*, v.58, p.304-308, 1986.

THUBRIKAR, M.J.; DECK, J.D.; AOUAD, J.; NOLAN, S.P. Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.86, p.115-125, 1983.

TOMAZIC, B.B.; BROWN, W.E.; SHOEN, F.J. Physicochemical properties of calcific deposits isolated from porcine bioprosthetic heart valves removed from patients following 2-13 years function. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 28, p. 35-47, 1994.

TOMIZAWA, Y.; NOISHIKI, Y.; OKOSHI, T.; KOYANAGI, H. Development of a small-caliber vascular graft with anti-thrombogenicity induced by extreme hydrophilicity. *ASAIO Trans.*, v.34, p.644-650, 1988.

TOWNS, J. K. Moisture content in proteins: its effects and measurement. *J. Chromat.*, v.705, p. 115-127, 1995.

TOWNS, J. K. Moisture content in proteins: its effects and measurement. *J. Chromat.*, v.705, p.115-127, 1995.

TU, R.; QUIJANO, R.C.; LU, C.L. A preliminary study of the fixation mechanism of collagen reaction with a polyepoxy fixative, *Int. J. Artif. Organs*, v.6, p.537-544, 1993.

TWARDOWSKI, J.; ANZENBACHER, P. Raman and IR spectroscopy in biology and. biochemistry. Chichester, U.K.: Ellis Harwood. P.107-109, 1994.

UEMATSU, M.; OKADA, M. A modified human ureter graft tanned by a new crosslinking agent polyepoxy compound for small diameter arterial substitutions: an experimental preliminary study. *Artif. Organs*, v.22, p.909-913, 1998.

VALENTE, M.; BORTOLOTTI, U.; THIENE, G. Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am. J. Pathol.*, v.119, p.12-21, 1985.

VYAVAHARE, N.R.; HIRSCH, D.; LERNER, E. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms. *Circul.*, v.95, p.479-488, 1997.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.*, v.203, p.1-60, 2000.

WEBB, I.; CORAL, F.; ANDERSON, J.; ELIAS, A.; FINBERG, R.; NADLER, L.; RITZ, J.; ANDERSON, K. Sources and squeal of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: Implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion*, v.36, p.782-788, 1996.

WOLFINBARGER, L. The basics of laboratory-scale mammalian cell cryopreservation. *Bio Pharm.*, (October), p.35-39, 1998.

WOODROF, E.A. Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue to valves. *J. Bioeng.*,v. 2, p.1-9, 1978.

XI, T.; LIU, F.; XI, B. Effect of pretreatment with epoxy compounds on the mechanical properties of bovine pericardial bioprosthetic materials. *J. Biomater. Appl.*, v.7, p.61-75, 1992.

XI, T.; MA, J.; TIAN, W.; LEI, X.; LONG, S.; XI, B. Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: a study of calcification tests in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.26, p.1241-1251, 1992.

YOGANATHAN, A.P. Cardiac valve prostheses. In: Bronzino, J.D., editor. *The biomedical engineering handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, p.1847-1870, 1995.

ZHOU, J.; QUINTERO, L.J.; HELMUS, M.N.; LEE, C.; KAFESJIAN, R. Porcine aortic wall flexibility. Fresh vs Denacol fixed vs glutaraldehyde fixed. *ASAIO J.*, v.43, p.470-475, 1997.

CAPÍTULO II

Determinação da temperatura de encolhimento do tecido de pericárdio bovino para aplicação como biopróteses de válvulas cardíacas por calorimetria exploratória diferencial e microscopia óptica acoplada a liofilização

1. INTRODUÇÃO

Quase 30 anos depois da primeira utilização de próteses valvulares, pacientes do mundo inteiro continuam sendo submetidos à implantação ou substituição de próteses de válvulas cardíacas. As próteses confeccionadas a partir de tecidos provenientes do pericárdio bovino (PB) tornaram-se dispositivos comumente aceitáveis para a substituição destas válvulas. A utilização de glutaraldeído como agente de modificação química e estrutural do tecido tornou-se uma prática comum para a maioria dos fabricantes destas válvulas, cada um deles desenvolvendo seus próprios métodos de modificação química. O glutaraldeído estabiliza a estrutura do colágeno, previne a degradação do tecido por enzimas ou ação das bactérias e ainda reduz a antigenicidade do material (Nimni *et al.*, 1987).

Os tecidos biológicos utilizados na confecção de biopróteses são basicamente compostos por fibras de colágeno do tipo I. A estrutura das moléculas de água que envolvem as fibras de colágeno vem sendo estudada por uma ampla variedade de metodologias (Renou *et al.*, 1994). A água exerce papel fundamental na manutenção da conformação das moléculas de colágeno

e nas propriedades mecânicas das fibras de colágeno (Bella *et al.*,1994). É comum aceitar, em um sistema simples, que a água associada com o colágeno pode ser dividida em três tipos: estrutural, ligada e livre (água em excesso). Acredita-se que a água estrutural estabiliza a conformação da tripla-hélice do colágeno através da participação nas pontes de hidrogênio na estrutura helicoidal do colágeno. A segunda fração corresponde às ligações entre as pontes de hidrogênio da água com a conformação de tripla-hélice e com o sistema microfibrilar do colágeno. A terceira fração consiste na interação entre a água livre com o sistema microfibrilar e fibrilar (Jastrzebska *et al.* 2003).

Estudos recentes determinaram a temperatura de encolhimento hidrotérmico nos tecidos de colágeno, observados como uma acentuada diminuição no comprimento do tecido, chegando a uma diminuição de 80% do comprimento total da amostra com uma sensibilidade nos valores de temperatura na faixa de 2 a 3°C, quando a amostra foi submetida a um programa de aquecimento. Este efeito resulta essencialmente da desnaturação da estrutura dos tropocolágenos induzida pelo aquecimento (Flory e Garrett, 1958). A temperatura na qual a desnaturação e consequentemente, o encolhimento do tecido ocorre, é denominada “temperatura de encolhimento”, um termo aplicado especificamente à temperatura de desnaturação do colágeno mesmo que esta seja medida por outros meios de análise. Um procedimento típico para tal determinação consiste em imobilizar a amostra por meio de grampos em um tensiômetro, mergulhar a amostra em uma solução

salina, ou simplesmente água destilada e submeter a amostra a um programa de aquecimento ininterrupto utilizando-se taxas de aquecimento que variam entre 0,5 e 1 °C/min. Quando o tecido se contrai a tensão aumenta rapidamente e a temperatura de início desta contração é definida como temperatura de encolhimento (Simionescu *et al.*, 1993). As limitações deste método hidrotérmico estão nas medidas das mudanças dimensionais em escala macroscópica, apresentando um limite máximo de temperatura de 100°C e ainda, as amostras são pré-tensionadas com pesos para mantê-las esticadas, podendo interferir nos resultados, retardando a contração do material, originando falsos valores de temperatura de encolhimento.

Vários trabalhos publicados na última década, utilizaram a calorimetria exploratória diferencial (DSC) como método alternativo na determinação da temperatura de encolhimento de tecidos biológicos (Chantal *et al.*, 1984; Fortune *et al.*, 1984; Fisher *et al.*, 1987; Bigi *et al.*, 1987; Ignatieva *et al.*, 2004; Siapi *et al.*, 2005). Entretanto, a DSC é uma ferramenta termo-analítica utilizada para a determinação de transições associadas à variações entálpicas em polímeros e outros compostos químicos. Para materiais a base de colágeno, um recipiente contém a amostra enquanto o outro recipiente (referência) é apenas selado sem conter nenhum tipo de material dentro. Os dois recipientes são submetidos a um programa de aquecimento e as diferenças no fluxo de calor entre eles indicam as transições e as respectivas diferenças entálpicas. Quando a amostra atinge a temperatura de

desnaturação, pelo menos um pico bem definido é observado no gráfico originado entre o fluxo de calor e a temperatura, juntamente com os valores de entalpia de cada transição ocorridos no experimento (Lee *et al.*, 1995).

A microscopia óptica acoplada a liofilização é uma ferramenta termo-analítica muito útil para a determinação das temperaturas de cristalização, colapso, fusão dos cristais de gelo e temperaturas eutéticas de soluções farmacêuticas a serem submetidas no processo de liofilização. O programa de temperatura do equipamento é estipulado para que o produto sofra o colapso ou fusão do material, dependendo das características específicas de cada produto a ser analisado.

Todo este processo pode ser visto tanto pela observação direta pelo microscópio como pelas imagens obtidas através da câmera instalada no equipamento e conectada diretamente no computador. O equipamento tem a capacidade de aquecer a amostra até temperaturas de 150 °C, entretanto, este procedimento nunca foi realizado anteriormente para a determinação da temperatura de desnaturação. Para garantir que os resultados obtidos pela técnica de microscopia óptica acoplada a liofilização foram precisos, realizou-se a determinação da temperatura de encolhimento dos tecidos (pericárdio bovino nativo e pericárdio bovino reticulado por glutaraldeído) pela DSC e os resultados entre as duas técnicas termo-analíticas foram comparados. O objetivo deste trabalho foi comparar os resultados da temperatura de

encolhimento dos tecidos de pericárdio bovino obtidos por DSC e microscopia óptica acoplada a liofilização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O PB foi obtido de um matadouro local onde foi previamente limpo para a remoção da gordura e em seguida transportado para o laboratório em solução salina (0.9% NaCl, peso/volume) e após, imerso em glicerina, visando a conservação do material. Precedendo as análises, as amostras foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) continuamente com agitação durante 15 minutos e o procedimento repetido 3 vezes para remoção do excesso de glicerina.

Reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído

O processo de reticulação do pericárdio bovino foi conduzido utilizando-se uma solução de glutaraldeído (GA) a 0.2% (p/p) em 0,2 M de tampão fosfato (pH 7,4) a 4 °C por 2 horas. As amostras foram imersas em solução com excesso de 2 ml.mg⁻¹ de tecido seco. Após o tratamento químico, o tecido de PB foi agitado em solução salina por três vezes de 15 minutos cada, para a retirada do excesso de GA (sobrenadante).

Análises de DSC

As curvas de DSC foram obtidas através de um equipamento da marca Shimadzu, modelo DSC 50 cell, utilizando-se recipientes (cadinhos) de alumínio contendo aproximadamente 2 mg de amostra. As análises foram conduzidas sob pressão dinâmica de nitrogênio de 50 mL min⁻¹ e submetidas a um programa de aquecimento de 10°C min⁻¹ com temperatura inicial de 25°C até temperatura final de 100°C. O equipamento foi calibrado usando-se Índio metálico (temperatura de fusão de 156,6°C; Energia entálpica de fusão (ΔH_{fus}) = 28,54 Jg⁻¹) e Zinco metálico (temperatura de fusão de 419,6°C). A taxa de aquecimento de 10 °Cmin⁻¹ foi utilizada com a finalidade de verificar a influência de vários parâmetros que podem influenciar os resultados das curvas de DSC de tecidos biológicos. As amostras submetidas à análises de DSC foram cortadas nas dimensões de 4 x 4 mm, lavadas por três vezes consecutivas, por 15 minutos cada lavagem, em agitador contendo solução fisiológica. Após este procedimento, as amostras foram secas em papel filtro por 1 minuto e imediatamente transferidas para os cadinhos de alumínio sendo colocadas dentro da célula do DSC iniciando-se o programa de temperatura.

Observação visual da temperatura de encolhimento

A temperatura de desnaturação do tecido de PB também foi determinada através de microscopia óptica acoplada à liofilização (Linkam, England), equipado com uma câmera de vídeo acoplado a um computador para captura das imagens. O equipamento consiste em uma pequena câmara de liofilização contendo um estágio de controle de temperatura, uma bomba de vácuo para garantir a redução da pressão atmosférica durante as análises e uma janela óptica na qual a amostra pode ser observada microscopicamente durante a análise. Utilizou-se um programa de temperatura com taxa de aquecimento de 2, 5 e 10 °Cmin⁻¹ para avaliar o efeito dos parâmetros do instrumento durante a determinação da temperatura de desnaturação do tecido biológico. É importante ressaltar que o microscópio óptico acoplado a liofilização foi utilizado apenas para visualizar o aquecimento da amostra até temperatura final de 100 °C sob pressão atmosférica. O sistema de vácuo permaneceu desligado durante as análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1 e 2 mostram as curvas de DSC contendo as respectivas derivadas (DDSC) do pericárdio bovino sem tratamento e reticulado com glutaraldeído respectivamente. O encolhimento do tecido é acompanhado por uma absorção de energia, originando um pico endotérmico para ambas as

amostras (tecido não tratado e reticulado) a $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ (± 1). A área do pico está diretamente relacionada com a energia entálpica envolvida no processo (ΔH) enquanto que a altura do pico é uma função direta da capacidade calorífica da amostra (dH/dT) durante a transição. A temperatura da transição pode ser definida como o início do pico ou o máximo pico do evento térmico. Observou-se também que os valores de temperatura dos picos utilizados para reportar a temperatura de encolhimento da amostra originou menor desvio na linha base do gráfico quando comparado com os valores extrapolados durante o início do evento. De acordo com Loke e Khor, 1995, recomenda-se que o valor de temperatura do pico deva ser considerado como a temperatura de encolhimento do tecido.

As temperaturas de encolhimento do tecido foram as mesmas para ambas as amostras (não tratadas e reticuladas), entretanto, o valor de ΔH envolvido durante a desnaturação do material apresentou diferenças significativas entre as amostras.

O PB reticulado com glutaraldeído apresentou um aumento de 5 vezes no valor de ΔH quando comparado com o tecido não tratado. Esta diferença pode ser explicada devido à forte estrutura formada entre as fibras de colágeno do tecido reticulado após o tratamento com glutaraldeído.

Figura 1. Curva DSC/DDSC do tecido de pericárdio bovino nativo, obtida sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}) e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

Figura 2. Curva DSC/DDSC do tecido de pericárdio bovino reticulado por glutaraldeído, obtida sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}) e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

Analisando as figuras 3 e 4 podemos observar o encolhimento das fibras de colágeno do tecido de pericárdio bovino (não-tratado e reticulado) respectivamente, através das análises de microscopia óptica acoplada a liofilização à aproximadamente 60 °C. Estes valores estão bem próximos ($n=5$, S.D.= 0.61) daqueles obtidos através das análises de DSC. Pode-se observar, em ambos os tipos de tecido, o encolhimento visual das fibras de colágeno quando a temperatura da análise atinge 60 °C.

Figura 3. Microscopia óptica do pericárdio bovino reticulado por glutaraldeído. Imagens capturadas em diferentes temperaturas: (A) 30,5 °C; (B) 40,8 °C; (C) 49,9 °C; (D) 59,9 °C.

Figura 4. Microscopia óptica do pericárdio bovino nativo. Imagens capturadas em diferentes temperaturas: (A) 30,9 °C; (B) 40,4 °C; (C) 50,5 °C; (D) 60,5 °C.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a temperatura de encolhimento das fibras de colágeno através das análises de microscopia óptica acoplada a liofilização coincidiram com os valores obtidos pela DSC. A microscopia óptica acoplada a liofilização pode ser usada como uma ferramenta muito útil para a determinação da temperatura de encolhimento de tecidos biológicos compostos principalmente por fibras de colágeno.

4. REFERÊNCIAS

BELLA J, BRODSKY B, BERMAN HM. Crystal-structure and molecular-structure of a collagen-like peptide at 1.9-Angstrom resolution, *Science*, v.266, p.75-81, 1994.

BIGI A, COJAZZI G, ROVERI N, KOCH MHJ. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation, *Int. J. Biol. Macromol.*, v.9, p.363-367, 1987.

FISHER J, GORHAM SD, HOWIE AM, WHEATLEY DJ. Examination of fixative penetration in glutaraldehydetreated bovine pericardium by stratigraphic analysis of shrinkage temperature measurements using differential scanning calorimetry, *Life Supp. Syst.*, v.5, p.189-193, 1987.

FLORY PJ, GARRETT RR. Phase transitions in collagen and gelatin systems, *J. Am. Chem. Soc.*, v.1, p.80, 1958.

FORTUNE F, CHANTAL B, DANIEL H. A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen, *Biochim. Biophys. Acta*, v.791, p.205-211, 1984.

IGNATIEVA N.Y., LUNIN V.V., AVERKIEV S.V., MAIOROVA A.F., BAGRATASHVILI V.N., SOBOL E.N. DSC investigation of connective tissues treated by IR-laser radiation, *Thermoch. Acta*, v.442, p.43-48, 2004.

JASTRZEBSKA M., WRZALIK R., KOCOT A., ZALEWSKA-REJDAK J., CWALINA B. Hydration of glutaraldehyde-fixed pericardium tissue: Raman spectroscopic study", *J. Raman Spectrosc.* v.34, p.424–431, 2003.

LEE J.M., PEREIRA C.A., ABDULLA D., NAIMARK W.A, CRAWFORD I. A multi-sample denaturation temperature tester for collagenous biomaterials", *Med. Eng. Phys.*, v.17, p.115-121, 1995.

LOKE, W. K. AND EUGENE KHOR E. Validation of the shrinkage temperature of animal tissue for bioprosthetic heart valve application by differential scanning calorimetry, *Biomaterials*, v.16, p.251-258, 1995.

Nimni, M. E., Cheung, D., Strates, B., Kodama, M. and Sheikh, K. Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement , *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 21, p.741-771, 1987.

RENOU JP, BONNET M, BIELICKI G, ROCHDI A, GATELLIER P. NMR study of collagen water interactions, *Biopolymers*, v.34, p.1615 – 1623, 1994.

SIAPI E., MAVROMOUSTAKOS T., TRANDAFIR V., ALBU B., BUDRUGEAC P. The use of differential scanning calorimetry to study the effects of gentamycin on fibrous collagenous membranes, *Thermoch. Acta*, v.425, p.165-171, 2005.

SIMIONESCU D, SIMIONESCU A, RADU D. Mapping of glutaraldehyde-treated bovine pericardium and tissue selection for bioprosthetic heart valves, *J. Biomed Mater. Res.*, v. 27, p.697-704, 1993.

CAPÍTULO III

A influência do material de confecção do cadinho nas propriedades térmicas de soluções binárias durante as análises de DSC comparadas com os resultados obtidos por microscopia óptica acoplada a liofilização.

1. INTRODUÇÃO

A liofilização é conhecida como um método de secagem muito útil para a redução do conteúdo de água de produtos termolábeis, como por exemplo, produtos farmacêuticos, alimentos e materiais biológicos. Entretanto, o consumo de energia envolvido durante o processo é relativamente alto quando comparado aos demais processos de secagem, tornando-o uma tecnologia de secagem de alto custo. O objetivo principal da utilização das análises térmicas a baixas temperaturas é identificar os parâmetros críticos de temperatura para o congelamento e secagem primária, assim como, as características que contribuem para o comportamento de um produto durante o processo de liofilização. Também, com o objetivo de reduzir o tempo e o consumo de energia, se faz necessário o estudo das propriedades térmicas de um produto antes do seu processamento por liofilização para otimizar as condições de secagem, enquanto mantêm-se as mais altas qualidades do produto final.

Durante o processo de liofilização de um produto, seja ele farmacêutico, alimento ou material biológico, a determinação precisa da temperatura de colapso é o parâmetro principal para a otimização do ciclo de liofilização e

para o próprio controle do processo. Para isso, é importante ter conhecimento preciso e confiável destes parâmetros com o objetivo de manter a temperatura do produto a mais alta possível, ou seja, a mais próxima da temperatura crítica de processo durante a secagem primária sem atingir a temperatura de colapso do produto (Liapis *et al.*, 1996). Durante a etapa do congelamento do processo de liofilização, caso o soluto apresente cristalização total na solução, sabe-se que a temperatura máxima permitida durante a secagem primária é a temperatura eutética (T_{eut}). A T_{eut} consiste em uma temperatura específica, na qual a fase líquida de uma solução congelada começa a aparecer durante o aquecimento do material. Para solutos que formam uma mistura eutética com a água, T_{eut} será idêntica à temperatura de fusão da fase intersticial da matriz congelada (T_{im}) (Willians e Polli, 1988). Durante a liofilização de um material que apresenta cristalização total, a temperatura do produto não deverá ultrapassar a T_{eut} , caso contrário ocorrerá a fusão da matriz congelada, ocasionando conseqüentemente a perda do produto. Entretanto, um tipo de comportamento mais comum que ocorre durante o congelamento de um material, baseia-se na formação de um estado amorfo onde a matriz congelada apresenta um aumento brusco na viscosidade, conforme o produto é submetido ao congelamento. A matriz congelada continua a aumentar a viscosidade até atingir uma temperatura crítica denominada temperatura de transição vítrea (T_g'), abaixo desta, o material amorfo apresenta-se com as características físicas de um vidro (Levine e Slade, 1988). Com a secagem

primária conduzida abaixo desta temperatura, o produto irá reter sua microestrutura estabelecida anteriormente durante o congelamento. À temperaturas acima desta transição, denominada, temperatura de colapso (T_c), o material amorfo apresentará uma diminuição da viscosidade, levando a um aumento no fluxo da fase líquida em função do tempo de liofilização, resultando no colapso estrutural da matriz congelada e conseqüentemente na perda geral das propriedades desejáveis do produto liofilizado. Neste caso, é a temperatura de colapso que representa a temperatura máxima permitida do produto durante a secagem primária (Knopp e Nail, 1998). É muito importante ressaltar que a T_g' é uma transição de segunda ordem e representa a temperatura na qual ocorre o aumento da difusibilidade da água na matriz congelada em função do tempo e da temperatura, enquanto que o colapso é um fenômeno dinâmico que acontece na interface de liofilização do produto onde a água intersticial na matriz congelada torna-se significativamente móvel (Jennings, 1999). Entretanto, a T_c geralmente é considerada próxima à T_g' , de 1 a 2 °C acima da temperatura de transição vítrea (Pikal e Shah, 1990).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) tem sido utilizada como ferramenta muito útil para a determinação das mudanças físico-químicas (reações endo e exotérmicas) e do comportamento do produto durante o congelamento e aquecimento. Esta técnica é utilizada para a determinação das transições de fase correlacionadas com a cristalização e fusão do material em determinadas temperaturas, assim como, na caracterização da T_g'

específicas de cada produto. Durante o congelamento e o aquecimento nas análises de DSC, uma mudança ou um aumento no calor específico da amostra reflete a diferença no fluxo de energia da amostra caracterizando um evento térmico. Esta diferença no calor específico é gravada e um gráfico é gerado em função da temperatura (Thomas e Cannon, 2004). Para a realização das análises de DSC, as amostras são comumente colocadas em recipientes denominados “cadinhos” de alumínio. Entretanto, as soluções farmacêuticas, geralmente são envasadas em frascos de vidro do tipo I (borosilicato). O comportamento térmico durante o congelamento (nucleação dos cristais de gelo e o crescimento dos mesmos) levarão a diferenças quanto à taxa de secagem e textura do produto final. A cristalização de uma solução farmacêutica é um processo estocástico por natureza: os cristais de gelo da mesma amostra sofrerão nucleação em diferentes temperaturas (geralmente com 2°C de diferença) em ciclos repetidos de congelamento (Malzahn-Kampe *et al.*, 1989). Além do mais, a natureza deste fenômeno é ainda mais amplificada pela heterogeneidade entre as amostras (presença de particulados). Portanto, a temperatura de cristalização é alvo de desvios quanto aos valores, devido à presença de particulados microscópicos, características do material de acondicionamento da amostra e pela própria natureza estocástica do fenômeno da nucleação. A heterogeneidade nos valores de temperaturas de nucleação, entre as amostras, ou mesmo entre as

diferenças nas condições de análises resultará em uma morfologia de cristais de gelo muito heterogênea.

O objetivo deste estudo é investigar a influência do material de confecção do cadinho nas propriedades térmicas pela DSC de soluções binárias distintas: solução de trealose 5%, solução de cloreto de sódio 0,9 % e solução de colágeno 0,1 %. A T_c e a T_{eut} destas soluções foram determinadas por microscopia óptica acoplada a liofilização e sistematicamente foram comparadas com a T_g' e T_{eut} medidas pela DSC com o intuito de confirmar (ou não) a similaridade dos resultados entre ambas as técnicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As soluções binárias utilizadas neste estudo foram preparadas como se segue: solução de trealose a 5% (p/p) de d(+)-Trealose diidratada (Sigma-Aldrich- USA), solução de colágeno tipo I a 0,1 % proveniente da epiderme de carneiros preparadas em 0,1 N em ácido acético (p/v) (Sigma-Aldrich-USA), e solução de Cloreto de Sódio 0,9 % (p/p) (Aster produtos médicos Ltda – Brazil).

Três diferentes cadinhos foram utilizados neste estudo: cadinho de alumínio padrão de 40 μ l, cadinho de vidro tipo I (borosilicato) de 40 μ l e cadinho de quartzo de 40 μ l, cada um deles apresentando diferentes valores de condutividade térmica (tabela I) (Young, 1991). Os cadinhos de vidro e

quartzo foram confeccionados seguindo as mesmas dimensões do cadinho de alumínio padrão para evitar a influência da massa do cadinho sobre o fluxo de calor da amostra durante as análises de DSC.

Tabela I. Condutividade térmica dos materiais utilizados na confecção dos cadinhos

Material do Cadinho	Condutividade térmica ($\text{W.m}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$)
Alumínio	237
Vidro Tipo I (borosilicato)	1,14
Quartzo	1,4

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise térmica por DSC foi utilizada para a determinação da $T_{\text{crist.}}$, T_g e T_{eut} das soluções binárias. O DSC utilizado neste estudo foi um Mettler-822 equipado com acessório de resfriamento (intracooler) para temperaturas sub-ambientes. A calibração do equipamento foi feita utilizando-se água destilada (ponto de fusão a 0°C e $\Delta H_{\text{fusão}} = 335 \text{ Jg}^{-1}$). Para cada tipo de cadinho utilizado no experimento, um cadinho vazio foi utilizado como referência. Os experimentos de DSC foram conduzidos sob atmosfera de Nitrogênio (N_2) com vazão de 50 mLmin^{-1} . Para se eliminar a influência do volume de envase sob a temperatura de cristalização, exatamente $40 \text{ }\mu\text{l}$ de

cada solução foram pipetadas dentro dos cadinhos e em seguida resfriadas de 25°C até -50°C à uma razão de resfriamento de 5°Cmin⁻¹ seguidas por uma isoterma de 5 minutos para garantir estabilidade e homogeneidade na temperatura da amostra. Após a etapa do congelamento, as amostras foram submetidas ao aquecimento até temperatura final de 25°C utilizando-se razão de aquecimento de 5°Cmin⁻¹. Todos os valores de T_g' foram considerados como sendo as temperaturas críticas durante o evento térmico (ponto médio) originadas pelo próprio programa do equipamento de DSC. As variações relativas à capacidade calorífica da T_g' (ΔC_p , in J g⁻¹ °C⁻¹) foram calculadas através do programa *STARe*. Os resultados foram obtidos de pelo menos três experimentos.

Microscopia óptica acoplada à liofilização

As temperaturas de colapso das soluções binárias foram determinadas por um microscópio óptico acoplado à uma câmara de liofilização (FDCS 196, Linkam Scientific Instruments, Surrey, U.K.) equipado com um sistema de resfriamento por nitrogênio líquido e com um módulo de controle de temperatura (TMS94, Linkam), que permite executar programas de temperatura com razões de aquecimento e resfriamento de 0,01 a 130°Cmin⁻¹. O equipamento foi calibrado utilizando-se solução de NaCl a 0,9 % (T_{eut} -21,1°C). As medições das temperaturas de transição foram realizadas em

intervalos de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As amostras foram colocadas em laminas de quartzo com 16 milímetros de espessura (Linkam) para eliminar os gradientes de temperatura (o quartzo apresenta condutividade térmica maior que o vidro). O óleo de silicone foi utilizado entre a lâmina e o sistema de aquecimento e resfriamento do microscópio para aumentar o contato térmico entre a amostra e o equipamento. As amostras foram resfriadas até temperatura final de -50°C com razão de resfriamento de $5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ seguidas por uma isoterma de 5 minutos para garantir estabilidade e homogeneidade da temperatura na amostra. Durante a etapa de secagem, o sistema foi evacuado até atingir a pressão de 100 mTorr (Edwards vacuum pump E2M1,5) mantida por um controlador de pressão “*gauge*” tipo Pirani. As observações visuais do processo de liofilização foram feitas através do microscópio polarizado da marca Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão). As imagens e vídeos foram obtidos através de uma câmera da marca Imasys (Suresnes, France) modelo JAI M50 CCD acoplada ao microscópio utilizando-se objetiva de 10X.

3. RESULTADOS

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As figuras 1a, 1b e 1c mostram a T_{crist} determinada por DSC de cada solução binária utilizada neste estudo. A T_{crist} é considerada um processo estocástico por natureza, entretanto, observou-se similaridade entre os resultados de T_{crist} principalmente para a solução de NaCl independentemente do tipo de cadinho utilizado nos experimentos (T_{crist} alumínio: -20,13 °C; T_{crist} quartzo: -21,44 °C; T_{crist} vidro: -20,50 °C). O desvio padrão para a temperatura de cristalização (SD_{crist}) para a solução de NaCl apresentou o menor valor (0,9 °C) seguido pelas soluções de colágeno e trealose, 3,8 e 5,3°C, respectivamente, entretanto, a energia entálpica envolvida na cristalização das soluções (ΔH_{crist}) variou consideravelmente entre os tipos de cadinho utilizados no estudo. Para as soluções de NaCl e trealose, observou-se um aumento de 3 vezes nos valores de ΔH_{crist} entre os cadinhos de vidro (NaCl ΔH_{crist} : 346,14 Jg⁻¹; trealose ΔH_{crist} : 403,32 Jg⁻¹) e quartzo (NaCl ΔH_{crist} : 342,87 Jg⁻¹; trealose ΔH_{crist} : 394,66 J.g⁻¹) comparado como cadinho padrão de alumínio (NaCl ΔH_{crist} : 115,85 Jg⁻¹; trealose ΔH_{crist} : 115,75 Jg⁻¹). Este comportamento pode ser explicado através de duas hipóteses: 1º) pela diferença nos valores de condutividade térmica específica de cada material de confecção do cadinho (Tabela I) e 2º) pelo tempo que cada solução binária levou para apresentar a cristalização total da água na formulação, originando um pico exotérmico com

áreas variáveis. A área do pico correspondente à cristalização é diretamente proporcional à reação exotérmica envolvida no evento térmico de cada cadinho utilizado no experimento. O cadinho de alumínio, devido à sua alta condutividade térmica, demandou menos energia para a cristalização das soluções quando comparado com os cadinhos de quartzo e vidro. É de grande importância ressaltar que a massa das amostras utilizadas durante as análises de DSC foram iguais para todos os experimentos ($43,0 \text{ mg} \pm 0,5$). A solução de colágeno apresentou a menor T_{crist} quando comparada às demais soluções. (alumínio: $-6,2^{\circ}\text{C}$; quartzo: $-10,7^{\circ}\text{C}$; vidro: $-11,93^{\circ}\text{C}$) provavelmente devido à influência das fibras de colágeno dispersas na solução de ácido acético, agindo como agentes indutores para a formação dos cristais de gelo.

Figura 1a

Figura 1b

Figura 1c

Figura 1. Curvas de DSC mostrando a temperatura de cristalização das soluções de NaCl (1A); trealose (1B) e colágeno (1C) utilizando-se diferentes cadinhos. As amostras foram resfriadas à -50°C utilizando-se razão de resfriamento de 5 °C min⁻¹.

A figura 2 compara a influência dos diferentes cadinhos na T_{eut} das soluções de NaCl e colágeno respectivamente. A solução de NaCl apresentou cristalização total e bem definida durante o congelamento da amostra e sabe-se que a mesma, forma uma mistura eutética à partir de soluções binárias com a água. O mesmo comportamento térmico foi observado para a solução de colágeno. Entretanto, a T_{eut} para esta solução atribuiu-se à formação de eutético do ácido acético presente na formulação. Esta afirmação pode ser confirmada baseando-se nos resultados de caracterização térmica por DSC das fibras isoladas de colágeno provenientes do tecido de pericárdio bovino (Tattini *et al.*, no prelo). No trabalho acima citado, as fibras de colágeno foram submetidas ao congelamento até temperatura final de -100°C , seguido pelo aquecimento com razão de $5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$, observou-se a T_g à $-81,3^{\circ}\text{C}$. Este valor está em acordo com os resultados obtidos por Curtil e colaboradores (Curtil *et al.*, 1997). Como as análises de DSC neste estudo foram conduzidas até a temperatura final de -50°C durante a etapa de congelamento, a curva de DSC da solução de colágeno registrou apenas os eventos térmicos relacionados com a solução de ácido acético presente na formulação. Observou-se que a T_{eut} da solução de NaCl em cadinho de vidro ($-22,67^{\circ}\text{C}$) e em cadinho de quartzo ($-22,45^{\circ}\text{C}$) apresentaram um aumento de aproximadamente $1,4^{\circ}\text{C}$ quando comparados aos experimentos realizados em cadinho de alumínio ($-21,08^{\circ}\text{C}$). Observou-se também um aumento de quase três vezes nos valores de energia entálpica envolvida na formação da fase eutética (ΔH_{eut}) entre os

experimentos em cadinho de vidro (ΔH_{eut} : $-10,81 \text{ Jg}^{-1}$) e quartzo (ΔH_{eut} : $-9,84 \text{ Jg}^{-1}$) comparados com os experimentos em cadinho de alumínio (ΔH_{eut} : $-3,65 \text{ Jg}^{-1}$). Novamente, este comportamento pode ser explicado devido às diferenças nos valores de condutividade térmica específicos de cada cadinho.

A trealose, um dissacarídeo não-redutor com características amorfas quando congelado em soluções aquosas, foi escolhido como sistema amorfo padrão neste estudo. O uso deste açúcar recebeu muita atenção no campo da pesquisa pela sua habilidade de atuar como lioprotetor. Durante o congelamento, a solução de trealose tende a formar uma matriz congelada super-saturada devido à incompleta cristalização da água no sistema. Neste caso, as características da formulação a ser liofilizada baseia-se na determinação da T_g' .

A figura 3 mostra a influência dos diferentes cadinhos utilizados nas análises de DSC sobre a detecção da T_g' da solução de trealose 5%. A T_g' é caracterizada por um declive na linha base da curva de DSC devido à mudança nos valores de calor específico envolvidos na transição. O valor de -30°C para a T_g' da solução de trealose 5% está de acordo com os trabalhos anteriormente publicados (Pyne *et al.*, 2002, 2003; Miller *et al.*, 1997). O valor de T_g' não foi influenciado pelo tipo de cadinho, entretanto, observou-se uma diferença considerável nos valores de capacidade calorífica envolvida nas transições (ΔC_p) entre os tipos de cadinhos utilizados nos experimentos. Pode-se observar um aumento de 4 vezes nos valores de ΔC_p para os cadinhos de

quartzo (ΔC_p : $0,242 \text{ Jg}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) e vidro (ΔC_p : $0,275 \text{ Jg}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) quando comparado com o cadinho de alumínio (ΔC_p : $0,069 \text{ Jg}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$). Estas diferenças podem ser explicadas pela condutividade térmica do material do cadinho associado à capacidade calorífica de cada material de confecção.

Figura 2a

Figura 2b

Figura 2. Curvas de DSC mostrando a fusão eutética (T_{im}) das soluções de NaCl (2A) e colágeno (2B) utilizando-se diferentes cadinhos. As amostras foram resfriadas até temperatura final de -50 °C com razão de resfriamento de 5 °C min⁻¹ seguido pelo aquecimento até temperatura final de 25 °C com razão de aquecimento de 5 °C min⁻¹.

Figura 3. Curva de DSC mostrando a T_g' da solução de trealose 5 % utilizando-se diferentes cadinhos. As amostras foram resfriadas até temperatura final de -50°C com razão de resfriamento de 5°C min^{-1} seguido pelo aquecimento até temperatura final de 25°C com razão de aquecimento de 5°C min^{-1} .

Microscopia óptica acoplada a liofilização

A T_{crist} para a cristalização da água é função direta da espessura da amostra, ou seja, a T_{crist} diminui conforme menor for a espessura da amostra (Mazur, 1966). Entretanto, neste estudo, apenas para a solução de colágeno, observou-se uma diferença notável de $11,7^\circ\text{C}$ na T_{crist} entre a análise térmica por DSC (quartzo T_{crist} : $-10,7^\circ\text{C}$) e a microscopia óptica acoplada à liofilização (T_{crist} : $-22,4^\circ\text{C}$) (figura 4). Observou-se também que a interface de liofilização da matriz congelada de trealose apresentou colapso total a -25°C , ou seja, 5°C acima da T_g' detectada por análises de DSC (figura 5). Há ainda,

experimentos específicos de DSC e microscopia óptica acoplada a liofilização, que foram realizados no laboratório, envolvendo diversos tipos de soluções farmacêuticas e constatadas diferenças maiores que 4°C entre a T_c e a T_g' (dados não publicados). Diante disso, devemos ter precaução em usar a noção de que a T_c geralmente é considerada 1 a 2 °C acima da T_g' .

Figura 4. Observação microscópica do congelamento da solução de colágeno. (A) solução supercongelada à -20°C ; (B) cristalização da solução à $-22,4^{\circ}\text{C}$. As amostras foram congeladas utilizando-se razão de resfriamento de $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

A perda da estrutura de um sistema composto pelo estado vítreo ocorre na interface de liofilização da matriz congelada. Entretanto, quando um sistema eutético está presente na formulação, a totalidade da matriz congelada apresenta perda da estrutura rígida do gelo formado, quando a formulação é submetida à um programa de aquecimento e a mesma atinge a T_{eut} . Este foi o caso das soluções de NaCl e colágeno (figuras 6 e 7 respectivamente), onde a T_{eut} da solução de NaCl (-21°C) e T_{eut} da solução de colágeno (-28°C)

apresentaram valores muito próximos da T_{eut} determinada por DSC (figura 2). Entretanto, provavelmente devido à diferença entre os valores de pressão de vapor do ácido acético (11 mm Hg a 20°C) e o da água (17,54 mm Hg a 20°C), foi muito difícil identificar a T_{eut} para a solução de colágeno. Esta foi caracterizada por uma sutil fusão dos cristais de gelo bem abaixo da interface de liofilização da matriz congelada.

Figura 5. Observação microscópica da solução de trealose. (A) retenção da estrutura física na camada liofilizada (não-colapsada); à -28°C ; (B) perda local da estrutura física ("micro-colapso") à $-25,2^{\circ}\text{C}$; (C) perda total da estrutura física ("colapso total") à $-23,9^{\circ}\text{C}$.

Figura 6. Observação microscópica da solução de NaCl. (A) retenção da estrutura física na camada liofilizada (não-colapsada); à -30°C ; (B) perda total da estrutura física ("colapso total") à -21°C .

Figura 7. Observação microscópica da solução de colágeno. (A) retenção da estrutura física na camada liofilizada (não-colapsada); à -36°C ; (B) perda total da estrutura física ("colapso total") à -28°C .

4. CONCLUSÃO

Neste estudo, a caracterização térmica de três soluções binárias foi determinada por DSC, utilizando-se três diferentes tipos de cadinho: alumínio, quartzo e vidro tipo I e os resultados foram comparados com as análises de microscopia óptica acoplada a liofilização. Os resultados mostraram que os valores de T_g' , T_{eut} e T_{crist} não sofreram influência pelo tipo de material de confecção do cadinho. Entretanto, a energia entálpica envolvida durante a cristalização da solução e na fusão da fase eutético, bem como o ΔC_p envolvido na T_g' apresentaram diferenças significativas. Este resultado pode ser explicado pelas diferenças nos valores de calor específico e condutividade térmica de cada material de cadinho usado no estudo. O cadinho de alumínio foi capaz de dissipar maior quantidade de energia envolvida em cada evento térmico quando comparado aos demais tipo de cadinhos. Durante a cristalização de uma solução, este resultado, aparentemente, pode influenciar o tamanho, a distribuição e a morfologia dos cristais de gelo presentes no produto, interferindo, conseqüentemente nos parâmetros de secagem durante a liofilização. O cadinho de alumínio normalmente utilizado nas análises térmicas por DSC não representa os valores reais envolvidos nos eventos térmicos que ocorrem durante a liofilização de produtos envasados em frascos de vidro. As diferenças observadas entre a T_{crist} durante as análises de DSC e a T_{crist} observada durante a etapa de congelamento do processo de liofilização

estão diretamente ligadas com o volume de envase da solução e com o tipo de material de acondicionamento do produto. De acordo com os resultados obtidos, ambas as técnicas de análises térmicas utilizadas neste estudo, mostraram boa exatidão e precisão, entretanto, mais cuidado deve ser usado quanto à noção de que a T_c pode ser considerada de 1 a 2 °C acima da T_g' .

5. REFERÊNCIAS

CURTIL A., PEGG D. E., WILSON A.. Freeze Drying of Cardiac Valves in Preparation for Cellular Repopulation. *Cryobio.*, v.34, p.13–22, 1997.

JENNING T.A., Lyophilization: Introduction and basic principles. Interpharm Press, Colorado, USA, 1999.

KNOPP S.A. e NAIL S.L.. The relationship between the TMDSC curve of frozen sucrose solutions and collapse during freeze-drying. *J. of Therm. Analys.*, v.54, p.659-672, 1998.

LIAPIS A.I., PIKAL M.J., BRUTTINI R.. Research and development needs and opportunities in freeze drying. *Dry. Technol.*, v.14, p.1265-1300, 1996.

LEVINE H. e SLADE L.. Thermomechanical properties of small-carbohydrate-water glasses and 'rubbers': kinetically metastable systems at sub-zero temperatures. *J. Chem. Soc.*, v.1, p.2619-2633, 1988.

MALZAHN-KAMPE J., COURTNEY T., LENG Y.. Shape instabilities of plate-like structures-I. Experimental observations in heavily cold worked in situ composites. *Acta Metall.*, v.37, p.1735-1745, 1989.

MAZUR P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. *Cryobio.* edited by H. T. Meryman. London: Academic. chapt. 6, p. 213-315, 1966.

MILLER D.P., PABLO J.J., CORTI H., Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions, *Pharm. Res.*, v.14, p.578–590, 1997.

PIKAL M. J. e SHAH S.. The collapse temperature in freeze-drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *Int. J. Pharm.*, v.62, p.165-186, 1990.

PYNE A., SURANA R., SURYANARAYANAN R.. Crystallization of Mannitol below T_g' during Freeze-Drying in Binary and Ternary Aqueous Systems. *Pharm. Res.*, v.19, p.894-900, 2002.

PYNE A., SURANA R., SURYANARAYANAN R. Enthalpic relaxation in frozen aqueous trehalose solutions. *Thermoc. Acta*, v.405, p.225–234, 2003.

THOMAS M. e CANNON A. J.. Low temperature thermal analyses are key to formulation design: electrical-resistance, L-T scanning calorimetry, and freeze-drying microscopy are three analytical methods that can be used to determine the thermal characterization of a product during processing for intended development of a lyophilization cycle. *Pharm. Technol.* v.1., p.20-25, 2004.

WILLIAMS N. A. e POLLI G.P.. Differential scanning calorimetric studies on frozen cephalosporin solutions. *Int. J. of Pharmac.*, v.44, p.205-212, 1988.

YOUNG, H. D. ASTM Standard test method for glass transition temperatures by differential scanning calorimetry or differential thermal analysis. *Univers. Phys.*, v.7, p.1356-1391, 1991.

CAPÍTULO IV

A influência da taxa de congelamento durante a liofilização do pericárdio bovino

1. INTRODUÇÃO

As biopróteses confeccionadas a partir de tecidos biológicos vem sendo utilizadas desde a década de 1960 como uma alternativa para as próteses mecânicas. Nos anos 70 as válvulas provenientes do pericárdio bovino começaram a ser utilizadas no campo dos transplantes cardíacos. O tecido de pericárdio bovino tem sido utilizado com grande sucesso como material para a fabricação de válvulas cardíacas (Chaikof, 2007). Geralmente, elas são tratadas em solução de glutaraldeído visando a reticulação do material e consequentemente a conservação do mesmo.

A liofilização é considerada como o melhor método de secagem de produtos farmacêuticos e biomateriais, os quais são muito sensíveis ao calor. O processo consiste na desidratação de um material previamente congelado, sendo a água retirada primeiramente por sublimação, seguida pela desorção da mesma, até níveis de umidade residual específicos para cada material, impedindo o desencadeamento de reações físicas, químicas e atividades biológicas. O processo envolve três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A etapa do congelamento é considerada por muitos

pesquisadores como sendo a fase mais crítica do processo, pois ela determina diretamente o tamanho, a distribuição e a morfologia dos cristais de gelo presentes no material, conseqüentemente influenciando as etapas de secagem primária e secundária (Patapoff e Overcashier, 2002; O'Brien *et al.*, 2004).

Na secagem primária, os cristais de gelo formados durante o congelamento, devem ser grandes o suficiente para facilitar sua sublimação. Entretanto, na secagem secundária, os espaços intersticiais deixados pelos cristais de gelo sublimados anteriormente devem apresentar uma grande área de superfície para facilitar a desorção da água que não apresentou cristalização durante o congelamento, originando assim uma matriz porosa com características otimizadas para se obter uma rápida reidratação do material (Jennings, 1999).

O tratamento térmico “*annealing*” quando empregado durante a etapa de congelamento, geralmente confere uma maior homogeneidade na distribuição e tamanho dos cristais de gelo. O tratamento térmico tem sido estudado por vários pesquisadores (Searles *et al.*, 2001; Abdelwahed *et al.*, 2006; Hawe & Friess, 2006). O *annealing* consiste no reaquecimento da amostra congelada até temperatura específica, geralmente acima da temperatura de transição vítrea do material congelado (T_g') mas, abaixo da temperatura de fusão dos cristais de gelo na amostra.

A determinação da T_g' de um material é considerada um parâmetro essencial para o melhor desempenho do processo de liofilização. Geralmente,

a temperatura do produto durante a secagem primária deve ser inferior a T_g' para se evitar o colapso da matriz durante o processo. Além do mais, a magnitude durante a mudança do calor específico envolvida na T_g' (ΔC_p) e o aparecimento da recristalização de algum componente do material durante o aquecimento do produto pode ter um efeito de grande relevância durante a liofilização a fim de se evitar a perda das propriedades físico-químicas e estruturais do produto final.

Portanto, o emprego da análise térmica para a detecção de dados como T_g' e recristalização é fundamental para evitar os efeitos indesejáveis na qualidade do produto final durante o processo de liofilização. Tais informações são muito valiosas em tempos atuais onde se busca a elegância farmacêutica nos produtos liofilizados (Sichina, 2000).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) fornece dados fundamentais para o desenvolvimento de parâmetros do processo de liofilização de um produto. Esta técnica apresenta alto grau de sensibilidade, resolução e desempenho em condições de temperaturas diversas (-150 a 600 °C) necessárias para observar transições de fases de baixa energia e eventos de recristalização associados à produtos a serem submetidos à liofilização. Para soluções aquosas simples, a T_g' vem sendo considerada de 1 a 2 °C abaixo da temperatura de colapso (T_c) (Pikal & Shah, 1990). A T_c geralmente é considerada muito próxima da T_g' e esta é caracterizada pela DSC (Levine & Slade, 1988; Chang & Randall, 1992). A T_c é caracterizada por observação

microscópica direta em microscópio óptico acoplado à uma unidade capaz de controlar a temperatura e a pressão empregada na análise, simulando as condições reais do processo de liofilização. Na verdade, a temperatura acima do início da mobilidade da água no sistema é observada experimentalmente em função do tempo caracterizando a transição vítrea na interface de liofilização. Entretanto, a T_c não pode ser considerada como uma temperatura idêntica à T_g' . A T_g' é determinada em sistemas fechados (cadinhos), após o congelamento da amostra e antecedendo a fusão dos cristais de gelo, enquanto que a T_c é um fenômeno dinâmico que acontece durante a liofilização do material (Nail *et al.*, 2002).

O tecido de pericárdio bovino é composto principalmente por fibras de colágeno tipo I (Naimark *et al.*, 1992). A espectroscopia Raman é considerada como uma ferramenta muito útil para o estudo das estruturas e interações moleculares de sistemas complexos. Este método foi utilizado com sucesso para o estudo da reticulação do colágeno por glutaraldeído. Uma das grandes vantagens desta técnica está na sua capacidade em fornecer informações sobre a estrutura e interações de biomoléculas em contato com células ou tecidos. A técnica não é destrutiva, não requer homogeneidade da amostra, ou mesmo a extração de agentes de contraste, ou até mesmo da embalagem do material a ser analisado. Por se tratar de uma técnica vibracional, a espectroscopia Raman apresenta mais vantagens quando comparada à espectroscopia por infra-vermelho, as propriedades estruturais de moléculas

em soluções aquosas são mais facilmente caracterizadas pela espectroscopia Raman (Jastrzebska *et al.*, 2003).

Os objetivos deste trabalho são: caracterizar o comportamento térmico do tecido de pericárdio bovino, investigar a influência das taxas de congelamento e do tratamento térmico durante a liofilização na estrutura secundária do colágeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O PB foi obtido de um matadouro local onde foi previamente limpo para a remoção da gordura e em seguida transportado para o laboratório em solução salina (0.9% NaCl, peso/volume) e após, imerso em glicerina, visando a conservação do material. Precedendo as análises, as amostras foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) continuamente com agitação durante 15 minutos e o procedimento repetido 3 vezes para remoção do excesso de glicerina.

Congelamento e liofilização

Os processos de liofilização foram conduzidos em um liofilizador da marca FTS Systems, modelo TDS-00209-A, controlado por microprocessador (Dura-Stop, Dura-Dry-MP). Amostras de 3 cm² foram colocadas em placas de Petri e submetidas ao congelamento lento com razão de resfriamento de

2 °C/min até o produto atingir temperatura final de -50 °C. As amostras submetidas ao congelamento rápido (razão de resfriamento de 30 °C/min foram imersas diretamente em nitrogênio líquido. Para a realização do tratamento térmico (annealing) as amostras foram primeiramente congeladas (congelamento lento ou rápido), aquecidas até temperatura de -20 °C, mantidas nesta temperatura por 1 hora e finalmente congeladas até temperatura final de -50 °C antes de iniciar a liofilização. A secagem primária foi conduzida com temperatura de placa de - 5 °C e pressão na câmara de 160 mTorr. A secagem secundária foi conduzida com temperatura de placa de 25 °C e a pressão na câmara de 160 mTorr.

Determinação da umidade residual

Os valores de umidade residual das amostras liofilizadas foram determinados por um equipamento da marca Computrac Vapor Pro modelo RX da Arizona Instruments, em temperatura constante de 100 °C.

Microscopia óptica acoplada à liofilização

As temperaturas de colapso dos tecidos de pericárdio bovino foram determinadas por um microscópio óptico acoplado a uma câmara de liofilização (FDCS 196, Linkam Scientific Instruments, Surrey, U.K.) equipado com um sistema de resfriamento por nitrogênio líquido e com um módulo de

controle de temperatura (TMS94, Linkam), o qual permite executar programas de temperatura com razões de aquecimento e resfriamento de 0,01 a 130 °C.min⁻¹. O equipamento foi calibrado utilizando-se solução de NaCl a 0,9 % (T_{eut} -21,1°C). As medições das temperaturas de transição foram realizadas em intervalos de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. As amostras foram colocadas em lâminas de quartzo de 16 milímetros (Linkam) para se eliminarem os gradientes de temperatura. O óleo de silicone foi utilizado entre a lâmina e o sistema de aquecimento e resfriamento do microscópio para aumentar o contato térmico entre a amostra e o equipamento. As amostras foram resfriadas até temperatura final de -50 °C com razão de resfriamento de 5 °C min⁻¹ seguidas por uma isoterma de 5 minutos para garantir estabilidade e homogeneidade da temperatura na amostra. Durante a etapa de secagem, o sistema foi evacuado até atingir a pressão de 100 mTorr (Edwards vacuum pump E2M1.5) mantida por um controlador de pressão “gauge” tipo Pirani. As observações visuais do processo de liofilização foram feitas através do microscópio polarizado da marca Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão). As imagens e vídeos foram obtidos através de uma câmera da marca Imasys (Suresnes, France) modelo JAI M50 CCD acoplada ao microscópio utilizando-se objetiva de 10X.

Determinação da temperatura de transição vítrea

Utilizou-se um calorímetro exploratório diferencial (DSC) da marca Seiko, modelo 220C (Seiko Instruments, Horsham, PA) com sistema de refrigeração por nitrogênio líquido. Os dados obtidos foram coletados e tratados utilizando-se o programa Seiko DSC 5200 Data Station. As amostras (30 mg) foram seladas em cadinhos de alumínio e um cadinho vazio foi utilizado como referência. O DSC foi calibrado para temperatura e valores de entalpia (ΔH) com *n*-dodecano (temperatura de fusão a $-9,65\text{ }^{\circ}\text{C}$)

As amostras foram resfriadas de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ até temperatura final de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando-se diferentes razões de resfriamento (1, 2, 10 e $30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e posteriormente aquecidas até temperatura final de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com razão de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A temperatura selecionada durante o tratamento térmico foi de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ baseada na temperatura de fusão dos cristais de gelo no tecido de pericárdio bovino. As amostras foram congeladas até temperatura final de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, aquecidas até temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando-se razão de aquecimento de $5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ com isoterma de 60 minutos e posteriormente congeladas novamente até temperatura final de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Análises estruturais

A estrutura secundária dos tecidos liofilizados e frescos (nativo) foi determinada por um espectroscópio FT-RAMAN, marca BRUKER, modelo FRA 106/S Raman módulo IFS 28/N. Os espectros foram coletados através de 4000 scans a 4 cm^{-1} de resolução. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). A intensidade do espectro foi calibrada usando-se modos vibracionais padrões C-H uma vez que o tecido de pericárdio bovino é constituído basicamente de sinais Raman C-H.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1a e 1b mostram as curvas de DSC obtidas durante o congelamento do pericárdio bovino. Observou-se um pico exotérmico durante o congelamento da amostra em diferentes razões de resfriamento: $-14,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($2^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$) e $-18,5^{\circ}\text{C}$ ($30^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$). Estes picos estão relacionados com a cristalização da água no tecido. O conhecimento deste comportamento térmico apresenta grande impacto no desenvolvimento dos parâmetros da liofilização, uma vez que, a temperatura de cristalização induz diretamente a distribuição, o tamanho e a geometria dos cristais de gelo formados no produto. Estes parâmetros estão diretamente relacionados com a taxa de sublimação durante a secagem primária.

Figura 1. Curva de DSC do pericárdio bovino. O tecido foi congelado com razão de resfriamento de $2^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ (A) e $30^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ (B). O gráfico foi obtido após o aquecimento da amostra (razão de aquecimento de $5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$). A temperatura de cristalização para o congelamento lento foi de $-14,2^{\circ}\text{C}$ e de $-18,5^{\circ}\text{C}$ para o congelamento rápido.

Após a determinação da temperatura de cristalização, as amostras foram resfriadas até temperatura final de -120 °C. As figuras 2a e 2b mostram as determinações da T_g' e da temperatura de fusão dos cristais de gelo no tecido. A transição vítrea obtida por DSC apresentou boa resolução e foi confirmada por sua derivada no gráfico.

A T_g' de qualquer substância amorfa pode ser definida como uma faixa de temperatura onde o calor específico envolvido na transição (ΔC_p) varia consideravelmente em função da temperatura e do tempo. Diferentes temperaturas podem ser consideradas para a caracterização da T_g' : o ponto inicial do evento térmico (T_{g0}), o ponto médio (T_{gm}), ou ainda, o ponto final (T_{ge}). Neste estudo, a T_g' foi expressa como sendo o valor do ponto médio com seu respectivo (ΔC_p) determinado pelo próprio equipamento.

Durante a etapa de aquecimento da amostra observou-se uma mudança na linha base do gráfico de DSC à -81,3°C, influenciada pela mudança no calor específico da amostra (figura 2a). Esta mudança na linha base está relacionada com a T_g' , onde, a água vítrea começa a perder viscosidade para valores inferiores a 10^{12} a 10^{14} Pa s. O valor de T_g' determinado neste estudo está bem próximo dos resultados obtidos por Curtil e colaboradores (1997), os quais determinaram a T_g' de válvulas cardíacas de porcos por DSC e detectaram um decaimento na linha base da curva à -83 °C. Ainda no

aquecimento, após a determinação da T_g' , observou-se a fusão dos cristais de gelo na amostra à -11,6 °C (figura 2b).

Figura 2. Curva de DSC do pericárdio bovino. A amostra foi aquecida até temperatura final de 25°C (razão de aquecimento de 5°C/min). (A) T_g' a -81,3°C; (B) fusão dos cristais de gelo na amostra a -11,6°C.

O tratamento térmico, também conhecido como “annealing”, é um processo térmico no qual a amostra é mantida em uma determinada temperatura por um tempo específico. Em geral, esta temperatura está entre a T_g' e a fusão dos cristais de gelo na amostra (Searles *et al.*, 2001). O “annealing” favorece a cristalização da água que foi armazenada na fase vítrea durante o congelamento da amostra. Observou-se um aumento de apenas 3 °C no valor da T_g' do pericárdio bovino após a utilização do “annealing” à temperatura de -20 °C por 1 hora (Figura 3). Mesmo após o emprego do “annealing” nas condições acima descritas, o valor da T_g' não diminuiu o suficiente para se permitir a liofilização abaixo da transição vítrea do material.

Figura 3. Curva de DSC do pericárdio bovino. O material passou pelo tratamento térmico “annealing” à temperatura de -20 °C por 1 hora. O valor da T_g' após o tratamento térmico aumentou para -78,1 °C.

Vários experimentos foram conduzidos utilizando-se microscopia óptica acoplada a liofilização para observação da temperatura de colapso do material, mas provavelmente, devido às características físicas da amostra, não foi possível observar nenhum sinal de colapso na estrutura do tecido durante a liofilização do material. Entretanto, foi possível observar visualmente, a cristalização da água no tecido durante o congelamento. Constatou-se também que o material não apresentou nenhuma mudança em sua estrutura mesmo com temperaturas superiores à T_g durante a liofilização.

A figura 4 mostra as alterações estruturais do pericárdio bovino, após a liofilização utilizando-se diferentes taxas de congelamento: 2 °C/min e 30 °C/min. Observaram-se alterações estruturais tanto na intensidade como nas posições dos picos no espectro Raman. Foi possível notar também alterações consideráveis nas intensidades dos picos nos comprimentos de onda de 939 cm^{-1} e 1004 cm^{-1} , picos relacionados ao estiramento dos grupos C-C α -hélice e C-C fenilalanina respectivamente. De acordo com Leikin *et al.*, 1997, o pico a 1004 cm^{-1} está relacionado com a perda de água estrutural do colágeno.

A região da Amida III também apresentou alterações estruturais nos picos de intensidade de 1240 a 1250 cm^{-1} devido ao estiramento das cadeias C-C pertencentes à estrutura de α -hélice específicas do colágeno tipo I.

Figura 4. Espectro Raman do pericárdio bovino liofilizado em diferentes taxas de congelamento. Congelamento lento ($2^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) e congelamento rápido ($30^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$).

As figuras 5a e 5b mostram os efeitos do tratamento térmico sobre a estrutura secundária do pericárdio bovino. Observou-se que o tratamento térmico realizado durante o congelamento lento foi capaz de manter as estruturas nas regiões da Amida III ($1241\text{-}1272\text{ cm}^{-1}$), relacionadas com o estiramento das cadeias C-N, e de conservar as formações das ligações $\text{CH}_3\text{-CH}_2$. Notou-se também, a manutenção das ligações estiramento peptil-carbonila na região da Amida I ($1655\text{ - }1667\text{ cm}^{-1}$).

Podemos observar na figura 6 as diferenças relacionadas ao tempo de liofilização em diferentes protocolos de congelamento. O tratamento térmico foi responsável pela redução no tempo total de liofilização apenas para as amostras que foram submetidas ao protocolo de congelamento lento.

Aparentemente, o tratamento térmico aplicado durante a etapa do congelamento foi responsável pela redução no tempo de secagem do material devido ao aumento no tamanho e na distribuição dos cristais de gelo. Segundo Searles e colaboradores (2001) tais alterações ocasionadas na matriz congelada alteram a taxa de sublimação do produto a ser liofilizado. Verificou-se também na figura 6^a (liofilização do pericárdio bovino utilizando-se protocolo de congelamento lento), um pico na secagem secundária. Este pico está relacionado com a evaporação de água sorvida presente no tecido. Este dado foi obtido pelo sistema de medição da quantidade de vapor de água (dew point system) presente na câmara de secagem do liofilizador. Provavelmente, este comportamento se deve à grande quantidade de água sorvida (vítrea) formada entre os cristais de gelo na matriz congelada da amostra.

A

B

Figura 5. Espectro Raman do pericárdio bovino liofilizado em diferentes protocolos de congelamento. (A) Efeito do annealing em diferentes taxas de congelamento; (B) Efeito do annealing utilizando-se o protocolo de congelamento lento.

Figura 6. Curvas de liofilização do pericárdio bovino em diferentes protocolos de congelamento. A) congelamento lento ($2^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$); B) congelamento rápido ($30^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$); C) congelamento lento com annealing; D) congelamento rápido com annealing.

A tabela 1 compara o conteúdo de umidade residual do pericárdio bovino liofilizado em diferentes protocolos de congelamento. Observou-se que as amostras liofilizadas submetidas ao congelamento lento, com ou sem o emprego do annealing, apresentaram os menores valores de umidade ($\sim 6\%$) quando comparado com as amostras liofilizadas com congelamento rápido com ou sem o emprego do annealing ($\sim 9\%$).

Tabela 1. Valores de umidade residual do pericárdio bovino liofilizado em diferentes protocolos de congelamento.

Protocolo	Teor de umidade (%)
Congelamento lento	6,64 ± 0,42
Congelamento rápido	9,47 ± 0,42
Congelamento lento com annealing	6,54 ± 0,28
Congelamento rápido com annealing	8,67 ± 0,32

n=10

4. CONCLUSÃO

Comparando-se todos os protocolos de liofilização utilizados neste estudo, o congelamento lento com annealing apresentou os melhores resultados quando comparado aos demais protocolos. Este protocolo foi responsável pela manutenção da estrutura secundária do colágeno, principalmente nas regiões da Amida I e III, apresentou o menor tempo de secagem primária, conseqüentemente, o menor tempo de liofilização, e também apresentou o menor conteúdo de umidade residual no tecido liofilizado. Entretanto, o tratamento térmico empregado nos diferentes protocolos de congelamento não foi suficiente para aumentar o valor da T_g' do material. Mesmo com os parâmetros de liofilização (temperatura de placa e

pressão na câmara) acima da temperatura de transição vítrea do pericárdio bovino, o produto final não apresentou nenhum sinal de colapso. Podemos concluir que o pericárdio bovino apresenta suporte físico suficiente para ser liofilizado acima da T_g' sem apresentar sinais de “encolhimento” da matriz liofilizada.

5. REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W., DEGOBERT G., FESSI H. Freeze-drying of nanocapsules: Impact of annealing on the drying process. *International Journal of Pharmaceutics*, 324, 74-82, 2006.

CHANG, B. S.; RANDALL, C. S. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization, *Cryobiology*, 29, 632-656, 1992.

CHAIKOF, E. L. The Development of Prosthetic Heart Valves - Lessons in Form and Function. *New England Journal of Medicine*, 357, 1368-1371, 2007.

CURTIL, A.; PEGG, D. E.; WILSON, A. Freeze Drying of Cardiac Valves in Preparation for Cellular Repopulation *Cryobiology*, 34, 13–22, 1997.

HAWE, A.; FRIESS, W. Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol-sucrose-NaCl formulations. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 64, 316-325, 2006.

JASTRZEBSKA M.; WRZALIK R.; KOCOT A.; ZALEWSKA-REJDAK J.; CWALINA B. Hydration of glutaraldehyde-fixed pericardium tissue: Raman spectroscopic study. *Journal of Biomaterial Science Polymer*, 34, 424–431, 2003.

JENNINGS, T.A. *Lyophilization Introduction and Basic Principles*, Interpharm, 1999.

LEIKIN S.; PARSEGHIAN V. A.; YANG W. H.; WALRAFEN G. E. Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices. *Proceedings of the National Academy of Science*, 94, 11312-11317, 1997.

LEVINE, H.; SLADE, L. Principles of “cryostabilization” technology from structure/property relationships of carbohydrate/ water systems-A review., *Cryo-Letters*, 9, 21-63, 1988.

NAIL, S. L.; JIANG, S.; CHONGPRASERT, S.; KNOPP, S. A. Fundamentals of freeze-drying. In *Development and Manufacture of Protein Pharmaceutical*; Kluwer/Plenum: New York, pp. 281-360, 2002.

NAIMARK W. A.; LEE J. M.; LIMEBACK H.; D. T. CHEUNG. Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species. *American Journal of Physiology*, 262, 1095-1106, 1992.

O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B. A.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, 25, 1077-1086, 2004.

PATAPOFF T. W.; OVERCASHIER D. E. The importance of freezing on lyophilization cycle development. *Biopharmaceutics*, 3, 16–21, 2002.

PIKAL, M. J.; SHAH, S. The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *International Journal of Pharmaceutics*, 62, 165-186, 1990.

SEARLES J. A.; CARPENTER J. F.; RANDOLPH T. W. Annealing to optimise the primary drying rate, reduce freeze-induced drying rate heterogeneity, and determine T_g in pharmaceutical lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Science*, 90, 872–887, 2001.

SICHINA W. J. Use of DSC for Lyophilization Optimization, Thermal analysis, PETech-01 Thermal Analysis, Application note, 2000.

Perspectivas

Diante dos resultados obtidos e apresentados nesta tese de doutorado, ficou demonstrado que o processo de liofilização pode ser aplicado com sucesso como método de conservação do pericárdio bovino, além de poder ser utilizado como ferramenta tecnológica para a preparação de novos materiais obtidos por modificações físico-químicas dos liofilizados.