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

Otimização da liofilização do pericárdio bovino com o auxílio de
ferramentas matemáticas

Camila Figueiredo Borgognoni

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

Co-orientador:

Profa. Dra. Joyce da Silva Bevilacqua

São Paulo
2009

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

Otimização da liofilização do pericárdio bovino com o auxílio de
ferramentas matemáticas

Camila Figueiredo Borgognoni

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

Co-orientador:

Profa. Dra. Joyce da Silva Bevilacqua

São Paulo
2009

Camila Figueiredo Borgognoni

Otimização da liofilização do pericárdio bovino com o auxílio de
ferramentas matemáticas

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 _____ de 2009.

DEDICATÓRIA

À minha família e aos meus amigos, em especial à minha mãe pelo apoio incondicional e a meu pai, *in memoriam*, que de algum lugar está compartilhando conosco esta felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo, professor notável, pela orientação.

À Profa. Dra. Joyce da Silva Bevilacqua, pela co-orientação.

Ao secretário Juarez Vieira de Souza pela atenção, ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Filipe C. P. Lima pela colaboração nas análises dinâmico-mecânicas.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo apoio e cooperação, e à Divisão de Bioengenharia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

BORGOGNONI, C. F. **Otimização da liofilização do pericárdio bovino com o auxílio de ferramentas matemáticas**. 2009. 99p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

A liofilização é um método de conservação utilizado para a obtenção de produtos desidratados de alta qualidade. É um processo que requer tempo e energia, podendo levar dias para terminar se o ciclo de liofilização não for otimizado. O objetivo da otimização do processo de liofilização é minimizar o consumo de energia e reduzir o tempo de processo, sem que ocorra a perda na qualidade do produto liofilizado. A utilização de modelos matemáticos que predizem o comportamento do produto durante a liofilização pode reduzir drasticamente o número de experimentos, além de determinar variáveis importantes que não podem ser medidas experimentalmente. Tecidos biológicos são produtos sensíveis que se submetidos à altas temperaturas podem sofrer alterações irreversíveis. O estudo da liofilização do pericárdio bovino tem como objetivo sua conservação, facilitando sua manipulação e armazenamento. O objetivo deste projeto foi o uso da teoria fenomenológica que envolve a liofilização, com a utilização de parâmetros essenciais determinados por experimentos de laboratório, para guiar o desenvolvimento de um modelo matemático capaz de descrever a dinâmica do processo de liofilização do pericárdio bovino para, através de seu estudo e da análise das características do produto liofilizado, alcançar a validação do processo. O estudo do congelamento na liofilização do pericárdio bovino foi feito, determinando-se os tempos de processo e o conteúdo de umidade residual do produto seco. A modelagem matemática do processo foi apresentada a partir da determinação de taxas de sublimação por microscopia óptica acoplada à liofilização, sob diferentes pressões de câmara e taxas de aquecimento de placa. Os produtos liofilizados foram avaliados quanto à manutenção de suas propriedades físicas. Os resultados mostraram que o congelamento lento com tratamento térmico apresentou curto tempo de liofilização e baixo valor de umidade residual do produto final. O modelo matemático demonstrou a liofilização do pericárdio bovino e o produto não apresentou alterações em suas propriedades físicas após o processo. Sendo assim, validou-se a técnica de microscopia óptica acoplada à liofilização na determinação da taxa de sublimação durante a liofilização do pericárdio bovino e validou-se o processo através da modelagem matemática.

Palavras-chave: Liofilização. Modelagem matemática. Pericárdio bovino.

BORGOGNONI, C. F. **Freeze-drying optimization of bovine pericardium by mathematical modeling**. 2009. 99p. Pharmaceutical Sciences School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Freeze-drying is a method of preservation that provides high-quality dehydrated products. It is a process that requires time and energy and it may take days to finish. Freeze-drying optimization is used to minimize the process time keeping the high quality of the product. Mathematical models that predict the behavior of products during freeze-drying can drastically reduce the number of experiments and determine variables in a study that could not be experimentally measured. Biological tissues are sensitive to heat and might be irreversibly modified. The study of bovine pericardium freeze-drying improves its handling and storage. The purpose of this project was to determine key parameters which served to guide the development of a mathematical model able to describe the bovine pericardium freeze-drying process and achieve its validation. The study of the freezing step in the bovine pericardium freeze-drying was done by analyzing the time of the process and the residual moisture content of the dried product. Mathematical modeling of the process was shown from the determination of sublimation rates by freeze-drying microscopy under different chamber pressures and heating rates. The freeze-dried products were evaluated for the maintenance of their physical properties. The results revealed that slow freezing with thermal treatment had short process time and low residual moisture of the final product. The mathematical model demonstrated the bovine pericardium freeze-drying and the product indicated no change in their physical properties after the process. Thus, the freeze-drying microscopy analysis was validated in determining the sublimation rate during the bovine pericardium freeze-drying and the process was endorsed through mathematical modeling.

Keywords: Freeze-drying. Mathematical modeling. Bovine pericardium.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01.	Válvula aórtica feita de pericárdio bovino.	18
FIGURA 02.	Liofilizador FTS Systems.	30
FIGURA 03.	Espectrofotômetro HunterLab.	30
FIGURA 04.	Equipamento Vapor PRO.	31
FIGURA 05.	Analizador dinâmico mecânico NETZSCH.	31
FIGURA 06.	Texturômetro TA-XT2.	32
FIGURA 07.	A) Acessório para testes de tração; B) Acessório para testes de punção.	32
FIGURA 08.	Microscópio eletrônico de varredura JEOL.	33
FIGURA 09.	Equipamento LYOSTAT.	33
FIGURA 10.	Medidas do corpo de prova para testes de tração, em mm.	35
FIGURA 11.	Medidas do corpo de prova para testes de punção, em cm.	36
FIGURA 12.	Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento lento (tempo de liofilização: aproximadamente 10 horas).	40
FIGURA 13.	Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento rápido (tempo de liofilização: aproximadamente 4 horas).	41
FIGURA 14.	Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento lento com <i>annealing</i> (tempo de liofilização: aproximadamente 4,5 horas).	41
FIGURA 15.	Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento rápido com <i>annealing</i> (tempo de liofilização: aproximadamente 6 horas).	42
FIGURA 16.	Pericárdio bovino fresco sem tratamento (A) e pericárdio bovino fresco reticulado em glutaraldeído (B).	45
FIGURA 17.	Representação das ligações cruzadas entre moléculas de colágeno e glutaraldeído.	45
FIGURA 18.	Representação da deformação sofrida pela amostra durante o teste de tração.	47

FIGURA 19.	A) Gráfico de força versus deslocamento de PB, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PB, obtido pelo programa MATLAB.	47
FIGURA 20.	A) Gráfico de força versus deslocamento de PBT, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PBT, obtido pelo programa MATLAB.	48
FIGURA 21.	A) Gráfico de força versus deslocamento de PBL, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PBL, obtido pelo programa MATLAB.	48
FIGURA 22.	A) Gráfico de força versus deslocamento de PBTL, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PBTL, obtido pelo programa MATLAB.	49
FIGURA 23.	Valores de elasticidade do pericárdio bovino sem tratamento (PB) e do pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído (PBT), antes e após a liofilização, obtidos por ensaios de tração.	50
FIGURA 24.	Valores de tensão de ruptura do pericárdio bovino sem tratamento (PB) e do pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído (PBT), antes e após a liofilização.	51
FIGURA 25.	Representação da deformação sofrida pela amostra durante o teste de punção.	52
FIGURA 26.	Gráficos de força versus deslocamento das amostras de pericárdio bovino analisadas, obtidos em ensaios de punção.	53
FIGURA 27.	Gráficos de tensão versus deformação das amostras de pericárdio bovino analisadas, obtidos em ensaio de punção.	54
FIGURA 28.	Valores de elasticidade do pericárdio bovino sem tratamento (PB) e do pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído (PBT), antes e após a liofilização, obtidos por ensaios de punção.	56

FIGURA 29.	Módulos de armazenamento em função da frequência de amostras de pericárdio bovino.	58
FIGURA 30.	Fotografias de MEV das superfícies lisas (lado esquerdo) e rugosas (lado direito) do pericárdio bovino liofilizado. (A, B) sem tratamento, (C, D) sem tratamento e colapsado, (E, F) reticulado em glutaraldeído, (G, H) reticulado em glutaraldeído e colapsado.	61
FIGURA 31.	Fotografias de MEV da superfície rugosa e da lateral do pericárdio bovino liofilizado. (A, B) sem tratamento, (C, D) sem tratamento e colapsado, (E, F) reticulado em glutaraldeído, (G, H) reticulado em glutaraldeído e colapsado.	62
FIGURA 32.	Fotos do pericárdio bovino obtidas por microscopia óptica acoplada a liofilização. Secagem primária: (A) 25 minutos, (B) 30 minutos, (C) 45 minutos e (D) 50 minutos.	63
FIGURA 33.	Formato da amostra considerada por Liapis; Litchfield (1979a) (A) e nesse estudo (B).	64
FIGURA 34.	Esquema do sistema considerado nesse estudo.	64
FIGURA 35.	Espessuras da camada seca ao longo do tempo de liofilização.	67
FIGURA 36.	Amostras de pericárdio bovino de diâmetros 1,5mm (A), 3,0mm (B), 4,5mm (C) e 6,0mm (D).	67
FIGURA 37.	Velocidades da camada seca ao longo do tempo de liofilização.	69
FIGURA 38.	Fluxos de vapor de água ao longo do tempo de liofilização.	69
FIGURA 39.	Temperaturas do produto, obtidas matematicamente, em diversas posições da interface, sob pressão de 160mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.	71
FIGURA 40.	Temperaturas do produto, obtidas matematicamente, em diversas posições da interface, sob pressão de 320mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.	72

FIGURA 41.	Temperaturas do produto, obtidas matematicamente, em diversas posições da interface, sob pressão de 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.	72
FIGURA 42.	Temperaturas do produto e temperaturas do ponto de orvalho (PO) ao longo do tempo de liofilização, obtidos experimentalmente.	73
FIGURA 43.	Comparação entre os perfis de temperatura do produto obtidos experimentalmente e simulados de uma liofilização sob pressão de câmara de 160mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.	75
FIGURA 44.	Comparação entre os perfis de temperatura do produto obtidos experimentalmente e simulados de uma liofilização sob pressão de câmara de 320mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.	75
FIGURA 45.	Comparação entre os perfis de temperatura do produto obtidos experimentalmente e simulados de uma liofilização sob pressão de câmara de 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.	76
FIGURA 46.	Temperaturas do produto ao longo do tempo de liofilização, simuladas matematicamente.	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 01.	Umidade residual das amostras liofilizadas submetidas a diferentes protocolos de congelamento.	43
TABELA 02.	Dados de colorimetria das amostras de pericárdio bovino analisadas.	44
TABELA 03.	Umidade residual das amostras de pericárdio bovino analisadas.	46
TABELA 04.	Dados obtidos nos ensaios de tração das amostras de pericárdio bovino analisadas.	50
TABELA 05.	Dados obtidos nos ensaios de punção das amostras de pericárdio bovino analisadas.	54
TABELA 06.	Dados de elasticidade à punção das amostras de pericárdio bovino analisadas.	56
TABELA 07.	Tempo de liofilização de amostras de diferentes tamanhos, sob pressão de 160mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.	68
TABELA 08.	Parâmetros utilizados na modelagem matemática e seus valores.	70
TABELA 09.	Tempos de liofilização obtidos experimentalmente e matematicamente, sob diferentes pressões de câmara.	71
TABELA 10.	Coeficientes de correlação entre as curvas experimentais e as obtidas matematicamente, de acordo com a posição da interface.	74
TABELA 11.	Valores de L^* , a^* e b^* do pericárdio bovino fresco, sem tratamento.	88
TABELA 12.	Valores de L^* , a^* e b^* do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído.	89
TABELA 13.	Valores de L^* , a^* e b^* do pericárdio bovino fresco, sem tratamento, liofilizado e reidratado.	90
TABELA 14.	Valores de L^* , a^* e b^* do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído, liofilizado e reidratado.	91

TABELA 15.	Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento.	92
TABELA 16.	Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído.	93
TABELA 17.	Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento, liofilizado e reidratado.	94
TABELA 18.	Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído, liofilizado e reidratado.	95
TABELA 19.	Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento.	96
TABELA 20.	Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído.	97
TABELA 21.	Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento, liofilizado e reidratado.	98

TABELA 22. Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído, liofilizado e reidratado.

NOMENCLATURA

t	= tempo (s)
T	= temperatura (K)
α	= difusividade térmica (m^2/s)
k	= condutividade térmica ($\text{kJ}/\text{m s K}$)
q	= fluxo de calor ($\text{kJ}/\text{m}^2 \text{ s}$)
x	= coordenada espacial da distância ao longo da espessura (m)
X	= coordenada da interface, uma função do tempo (m)
c_p	= calor específico ($\text{kJ}/\text{kg K}$)
ρ	= densidade (kg/m^3)
N	= taxa de sublimação ($\text{kg}/\text{m}^2 \text{ s}$)
L	= raio do produto (m)
P	= pressão (mTorr)
n	= porosidade
ΔH_s	= calor latente de sublimação do gelo (kJ/kg)
Δ	= taxa de aquecimento da placa (K/s)
σ	= constante de Boltzmann = $5,6484 \cdot 10^{-11}$ ($\text{kJ}/\text{m}^2 \text{ s K}^4$)
F	= fator de emissividade (adimensional)

Sub-Índices

t	= total
I	= região seca
II	= região congelada
o	= inicial
p	= placa
v	= vapor de água

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material	29
3.1.1 Matéria prima	29
3.1.2 Equipamentos	29
3.2 Métodos	34
3.2.1 Congelamento e liofilização	34
3.2.2 Avaliação da cor	34
3.2.3 Conteúdo de umidade residual	35
3.2.4 Teste de tração	35
3.2.5 Ensaios de punção	36
3.2.6 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)	37
3.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
3.2.8 Microscopia óptica acoplada a liofilização	37
3.2.9 Modelagem matemática	38
3.2.10 Análise estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Influência da taxa de congelamento na liofilização do pericárdio bovino	40
4.2 Efeito da liofilização nas propriedades físicas do pericárdio bovino.	44
4.2.1 Colorimetria	44
4.2.2 Conteúdo de umidade residual	46
4.2.3 Testes de tração	47
4.2.4 Ensaios de punção	52
4.2.5 Análise dinâmico mecânica (DMA)	57
4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
4.3 Modelagem matemática da liofilização do pericárdio bovino	63
5. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

APÊNDICE I	88
APÊNDICE II	92
APÊNDICE III	96

1. INTRODUÇÃO

Os materiais biológicos são utilizados há muito tempo na área médica, em diversas aplicações como enxertos, componentes estruturais, tubos e implantes e apresentam inúmeras vantagens quando comparadas às válvulas mecânicas, como por exemplo, biocompatibilidade e pouca imunogenicidade e trombogenicidade.

As próteses valvulares cardíacas heterólogas (provenientes de tecidos animais) são usualmente confeccionadas com pericárdio bovino (FIGURA 01). Elas são preferencialmente utilizadas em detrimento das próteses mecânicas devido ao baixo custo do material, a isenção de terapias anticoagulantes e a possibilidade de previsão de falhas (IONESCU *et al.*, 1977; COSGROVE *et al.*, 1985; TROWBRIDGE; CROFTS, 1987; BRAILE, 1990; ARCIDIACONO; CORVI; SEVERI *et al.*, 2005).

Figura 01. Válvula aórtica feita de pericárdio bovino.

O pericárdio bovino é uma membrana que reveste o coração do boi e para ser utilizado na fabricação de próteses valvulares precisa apresentar características mecânicas adequadas. O tecido é usualmente tratado com glutaraldeído a fim de reduzir a trombogenicidade e antigenicidade do material, além de modificar suas propriedades físicas (elasticidade e resistência mecânica), e conservado em formaldeído até sua utilização (CARPENTIER *et al.*, 1969; VAN NOORT *et al.*, 1982; YOSHIOKA *et al.*, 1999).

Os tecidos biológicos são produtos sensíveis que se submetidos à altas temperaturas podem sofrer alterações irreversíveis. Devido a isso, a liofilização

apresenta-se como uma alternativa na conservação desses produtos, facilitando sua manipulação e estocagem, além de possibilitar sua esterilização com raios gama. É um processo estudado há muitos anos na área de biotecnologia (COSGROVE *et al.*, 1985; FORD; DAWSON, 1994; OZAKI; HAYASHI, 1998; CURTIL; PEGG; WILSON, 1997; WANG, 2000; RINDLER; HESCHEL; RAU, 1999; MAIZATO, 2003; HAFEEZE *et al.*, 2005).

A liofilização consiste na secagem de um produto previamente congelado no qual a maior parte da água é removida por sublimação. 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 preferido para a conservação de materiais biológicos (JAMES, *et al.*, 1991; MLADENOV; TSVETKOV; VULCHANOV, 1993; PITOMBO, 2001; MAIZATO *et al.*, 2003; AIMOLI *et al.*, 2007; LEIRNER; TATTINI-JR; PITOMBO, 2009). O grande diferencial da liofilização está no fato de o produto permanecer no estado sólido durante todo o processo. A maior parte da água passa do estado sólido para o vapor sem passar pelo estado líquido, preservando assim a estrutura original do produto, obtendo-se ao final do processo, um produto com baixa umidade residual, poroso e de rápida reidratação. Modificações físico-químicas são inibidas, minimizando a perda de constituintes voláteis ou a perda de atividade biológica ou outra atividade na preservação da estrutura molecular (FORD; DAWSON, 1994; PITOMBO *et al.*, 1994; PITOMBO, 1999; PITOMBO; LIMA, 2003;).

Os produtos liofilizados possuem boa estabilidade durante o armazenamento, resultando em longo tempo de vida-de-prateleira (PITOMBO, 1989; FITZPATRICK; SAKLATVALA, 2003).

Um dos principais problemas do processo de liofilização é seu alto custo, tanto para o capital de investimento como para a operação do processo (RATTI, 2001). O outro é sua longa duração (1 a 3 dias). Isto ocorre devido à baixa transferência de calor interna dentro do produto, assim como a baixa pressão de operação do processo. A sublimação consome quase metade da energia total necessária ao processo (45%). O congelamento consome pouca energia (4%) e a redução da pressão e a condensação dividem igualmente o restante da energia (RATTI, 2001). Outra desvantagem do processo é a

fragilidade e a baixa densidade do produto liofilizado que resultam em um produto mais suscetível à oxidação e à sorção de umidade.

O custo da liofilização varia com o tipo de material a ser utilizado, com a duração do ciclo de secagem, etc. É importante incluir toda a energia usada quando se avalia ou se compara diferentes processos de secagem. A comparação entre liofilização e outros métodos de conservação de materiais biológicos, como por exemplo, a crioconservação, é vantajosa se compararmos com a energia gasta no armazenamento do material no freezer.

Um processo de liofilização otimizado pode ser obtido, se as condições de operação forem controladas, com o objetivo de minimizar o consumo de energia e redução de tempo de processo, sem que ocorra a perda na qualidade do produto liofilizado (OETJEN, 2004).

Muitos pesquisadores vêm demonstrando esforços significativos nas pesquisas que envolvem a análise de transferência de massa e calor com o objetivo de analisar e otimizar o processo de liofilização (MASSEY; SUNDERLAND, 1972; SHARMA; ARORA, 1993; RENÉ; WOLF; RODOLPHE, 1993; GEORGE; DATTA, 2002). Sagara; Ichiba (1994) estudaram métodos de medidas das propriedades de transporte na interface de liofilização em soluções de café, sabendo-se que as propriedades de transporte na camada de um material desidratado é um fator limitante na transferência de massa e calor durante o processo de liofilização. Boss; Maciel-Filho; Toledo (2004), Chakraborty; Saha; Bhattacharya (2006) e Velardi; Barresi (2008) estudaram a modelagem matemática para usá-la na otimização de ciclos de liofilização.

A tecnologia da liofilização consiste em quatro principais operações: congelamento, secagem primária, secagem secundária e armazenamento. A secagem primária baseia-se na retirada da água livre por sublimação do gelo e a secagem secundária envolve a remoção da água ligada por desorção.

A etapa do congelamento é considerada tão importante quanto a etapa de secagem, pois a estrutura dos poros do produto seco, que influenciará a taxa de transferência de massa e calor durante a secagem, é determinada pelos cristais de gelo que são formados durante o congelamento. Se os cristais de gelo formados forem pequenos e descontínuos, a taxa de transferência de

massa do vapor de água pela camada seca pode ser limitada. Se os cristais de gelo formados forem maiores e estiverem dispersos homoganeamente, a taxa de transferência de massa do vapor de água pela camada seca será maior e o produto secará mais rapidamente (PATAPOFF; OVERCASHIER, 2002; LIAPIS; PIKAL; BRUTTINI, 1996; O'BRIEN *et al.*, 2004; HOTTOT; VESSOT; ANDRIEU, 2007).

O material durante o congelamento pode formar misturas eutéticas ou estruturas altamente viscosas e amorfas. Sólidos amorfos não sofrem transições de fase definidas, mas podem apresentar redução de sua viscosidade em função da temperatura até não ser suficiente para sustentar sua estrutura. Esse fenômeno é chamado de colapso estrutural que possui um conceito semelhante à transição vítrea. Transição vítrea é um fenômeno de segunda ordem (dependente da temperatura e da concentração) e caracteriza-se pela diminuição da viscosidade da matriz congelada, ocasionando a perda da estrutura do material e levando ao colapso.

Para que o produto seja mantido no estado sólido durante todo o processo, ele deve ser congelado adequadamente e mantido a uma temperatura menor que sua temperatura de colapso.

O método escolhido durante o congelamento de um material pode ter um impacto significativo na morfologia dos cristais de gelo, afetando tanto a resistência encontrada pelo vapor de gelo durante a secagem primária, quanto às características do produto final.

O tratamento térmico, *annealing*, consiste em uma etapa de aquecimento do produto durante o congelamento capaz de aumentar a homogeneidade na distribuição e no tamanho dos cristais de gelo. Diversos autores estudaram este tratamento térmico no processo de liofilização (SEARLES; CARPENTIER; RANDOLPH, 2001; RANDOLPH; SEARLES, 2002; ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006; HOTTOT *et al.* 2009).

Modelos teóricos podem ser desenvolvidos para descrever o comportamento do produto durante o congelamento e podem ser utilizados para auxiliar na obtenção de uma estrutura de cristais de gelo, que no final da

secagem primária determinará uma estrutura porosa apropriada (LIAPIS; PIKAL; BRUTTINI, 1996; HOTTOT; VESSOT; ANDRIEU, 2006).

Na secagem primária os cristais de gelo presentes no produto são removidos por sublimação. O vapor de água produzido é transportado por difusão através dos poros da estrutura da camada seca e atingem a câmara de secagem do liofilizador. Ao final da secagem primária, o conteúdo de umidade residual no produto está em torno de 10 a 15%, e ao final da secagem secundária este conteúdo chega a níveis abaixo de 3%.

Os fatores críticos durante a secagem primária são as temperaturas do produto nas camadas seca e congelada, a quantidade de umidade na camada seca, a velocidade e temperatura da interface e a sua duração. O objetivo da otimização da secagem primária é encontrar condições de operação que minimizem sua duração, maximizando a velocidade da interface, sem provocar o colapso. A maioria desses fatores não podem ser determinados durante a secagem primária, mas modelos matemáticos podem providenciar muitas informações úteis para a otimização desta fase (LIAPIS; PIKAL; BRUTTINI, 1996; CHAKRABORTY; SAHA; BHATTACHARYA, 2006).

A sublimação dos cristais de gelo presentes no produto somente é possível porque durante a etapa primária da liofilização o produto congelado está em uma condição de pressão e temperatura abaixo do ponto triplo da água. Além disso, o condensador é uma peça indispensável para a retirada de água do produto em uma liofilização, pois com a formação de vapor de água há um aumento da pressão na câmara de secagem, o que brecaria a sublimação. O condensador é responsável pela captura do vapor de água do sistema para que a sublimação de todo cristal de gelo presente no produto ocorra e a condição de não-equilíbrio do sistema se mantenha. Ao sublimarem, as moléculas de água utilizam calor latente de sublimação (ΔH_s). Com isso, a temperatura do produto congelado reduz ainda mais. Caso não haja fornecimento de calor ao sistema, a pressão de vapor da água no produto se iguala à pressão parcial do vapor de água na câmara, fazendo com que o sistema entre em equilíbrio e que a sublimação cesse. Para que isso não ocorra, durante a liofilização o fornecimento de calor ao sistema é feito através

da placa de aquecimento do liofilizador. O fluxo de transferência de calor é modulado por condução, convecção e/ou radiação.

Os cristais de gelo contidos no produto, ao sublimarem, formam uma interface de transição entre a camada congelada e a camada seca, denominada *interface de sublimação*. Nessa região não existem mais cristais de gelo, mas o conteúdo de umidade presente permanece mais alto que o conteúdo de umidade na camada seca. A espessura dessa região é infinitesimal e pode ser considerada zero para simplificação de cálculos.

A pressão da câmara também influencia a transferência de calor e de massa e por isso é considerada um parâmetro importante no estudo do processo de liofilização. Diminuindo-se a pressão na câmara pode-se aumentar a taxa de sublimação. Isto significa que altas temperaturas de prateleira poderão ser empregadas utilizando-se baixas pressões na câmara, para atingir altas taxas de sublimação. Isto, entretanto, pode aumentar o risco de colapso do produto.

Na passagem da camada congelada para o condensador, o vapor de água precisa superar duas resistências: a da camada seca e a da câmara de secagem (PIKAL, 1985).

As resistências encontradas durante a transferência de massa podem ser minimizadas para se alcançar altas taxas de sublimação. As resistências externas encontradas pelo produto podem ser modificadas através de alterações feitas no *design* do frasco e no tipo de geometria utilizada na construção de um liofilizador (TANG; PIKAL, 2004).

A resistência da camada seca está relacionada com a estrutura porosa da matriz liofilizada. O vapor de gelo necessita ultrapassar uma complexa camada intersticial formada por canalículos vazios, que foram formados durante a sublimação. Assim, a estratégia mais produtiva para a otimização no tempo de secagem primária, está na modificação da estrutura porosa da matriz liofilizada a fim de se aumentar o tamanho dos espaços intersticiais e reduzir a resistência encontrada pelo produto seco (RANDOLPH; SEARLES, 2002).

Muitas técnicas são utilizadas para a determinação da taxa de sublimação durante a secagem primária. Alguns autores determinaram a taxa

de sublimação retirando amostras durante o processo de liofilização e medindo a perda de peso das amostras (OVERCASHIER; PATAPOFF; HSU, 1999; SEARLES; CARPENTIER; RANDOLPH, 2001; CHAKRABORTY; SAHA; BHATTACHARYA, 2006). Pikal; Roy; Shah (1984) descreveram uma técnica de micro-balanço para determinar taxas de sublimação pela medição da resistência da camada seca de diferentes materiais. Zhai *et al.* (2003) determinaram valores de coeficientes de difusão efetivos por microscopia óptica acoplada à liofilização e compararam com dados teóricos.

O final da secagem primária pode ser determinado por testes de pressão ou por meio de sensores de umidade. O teste de pressão é um procedimento no qual a válvula presente entre a câmara de liofilização e o condensador é fechada. O aumento da pressão da câmara após o fechamento da válvula indica que ainda existe água no produto (SHALAEV; ZOGRAFI, 1996). Já os sensores de umidade medem a temperatura de ponto de orvalho (*dew point*). A queda desta temperatura reflete redução da pressão de vapor na câmara do liofilizador.

A etapa da secagem secundária tem como objetivo a remoção da água residual a um nível ótimo de estabilidade. Consiste na remoção da água fortemente ligada à estrutura do produto por desorção. Ela representa uma pequena porção (10 a 35% do conteúdo total de umidade), quando comparada à água livre do produto, mas pode levar tanto tempo para ser removida quanto toda a água livre, devido às fortes ligações com as moléculas constituintes do produto.

Os fatores críticos durante a secagem secundária são a temperatura, a quantidade de umidade do produto e a duração da etapa. O objetivo da otimização da secagem secundária é encontrar condições que minimizem sua duração sem provocar o colapso, providenciando uma concentração final de umidade desejável. Como a concentração de umidade do produto não é facilmente medida durante a secagem secundária, modelos matemáticos podem ser utilizados como ferramentas (PIKAL *et al.*, 1990; LIAPIS; PIKAL; BRUTTINI, 1996; SHEEHAN; LIAPIS, 1998).

A última operação que consiste a tecnologia da liofilização é o armazenamento. O conhecimento do caráter higroscópico de um produto

liofilizado é muito importante para a determinação das melhores condições de armazenamento a fim de que sejam criadas barreiras eficientes à transferência de água entre o produto e o ambiente (AYROSA *et al.*, 2007).

A utilização de modelos matemáticos que demonstram o comportamento do produto durante o processo de liofilização vem sendo estudada há muitos anos (LIAPIS; LITCHFIELD, 1979a; MUJUMDAR; LI; JOG, 1980; PIKAL, 1985; SHEEHAN; LIAPIS, 1998; LIAPIS; BRUTTINI, 1995; LOMBRANA; IZKARA, 1996; BOSS; MACIEL-FILHO; TOLEDO, 2004). Segundo Liapis; Pikal; Bruttini (1996), sua utilização é extremamente vantajosa, pois os modelos podem:

- reduzir significativamente o número de experimentos pilotos;
- guiar experimentos em regiões nas quais um melhor conhecimento científico e físico-químico é necessário e até mesmo permitir observar novos fenômenos;
- determinar os valores de variáveis que não podem ser medidas experimentalmente e que são importantes para se obter altas taxas de secagem e a estabilidade do produto seco, como por exemplo: os valores da velocidade de convecção do vapor de água dentro dos poros da matriz do produto seco e do gradiente de pressão e das taxas de transferência de massa e calor nos poros do produto seco;
- determinar a umidade do produto em um certo tempo do processo de liofilização, proporcionando uma informação bastante útil para a avaliação da estabilidade do produto;
- ser utilizados em simulações de computador para investigar o impacto dos desvios das variáveis de processo como a temperatura de placa e pressão da câmara. Os dados simulados podem ser comparados com dados obtidos experimentalmente e utilizados na validação do processo;
- auxiliar no estudo de escala industrial de processos de liofilização;
- indicar a contribuição de cada mecanismo de transferência de massa e calor para auxiliar na determinação do mecanismo que está controlando o processo;

- avaliar e comparar, para um determinado produto, a performance de diferentes designs de liofilizadores.

King (1971) propôs um modelo denominado URIF (*Uniformly Retreating Ice Front*). O modelo foi desenvolvido em cima da suposição de que a interface de sublimação retrai uniformemente. Mas outros autores contestaram esse modelo estudando a taxa de sublimação durante a liofilização (SHENG; PECK, 1977).

Desde então, modelos que se baseavam em equações de balanço de energia e massa, no estado de não-equilíbrio, passaram a ser desenvolvidos.

Liapis; Litchfield (1979a) foram os pioneiros nessa linha de pesquisa e mostraram que seus modelos representavam bem os dados experimentais. Eles desenvolveram um modelo baseado nos trabalhos de Evans; Watson; Mason (1962) e Mason; Malinauskas; Evans (1967), que estudaram a difusão de gases em meios porosos. Nesse modelo, denominado *modelo de sublimação*, os autores só descreveram a remoção de água livre, por sublimação.

Litchfield; Liapis (1979) propuseram, em seguida, um modelo semelhante, que permite descrever a desorção e a sublimação simultaneamente, alegando que a existência de água adsorvida na camada seca pode influenciar na quantidade de calor que atinge a interface e conseqüentemente, alterar sua velocidade. Outros estudos também se basearam neste modelo (MILLMAN; LIAPIS; MARCHELLO, 1985; LIAPIS; BRUTTINI, 1994).

Mais tarde Sadikoglu; Liapis (1997) verificaram que o efeito da desorção durante a sublimação não é significativo.

Ferguson; Lewis (1993) e Mascarenhas; Akayavby; Pikal (1997) desenvolveram modelos em duas dimensões para simular a liofilização em frascos, uma vez que a maioria dos produtos farmacêuticos são liofilizados dessa maneira. Na liofilização em frascos, além dos efeitos longitudinais, os efeitos radiais também devem ser levados em consideração. Mas os estudos

foram criticados, pois os modelos não conseguiram descrever o movimento da interface em toda a extensão do diâmetro do frasco.

Outros estudos se seguiram para aperfeiçoar a modelagem matemática da liofilização de produtos em frascos (SHEEGAN; LIAPIS, 1998; HOTTOT *et al.*, 2006).

Diversas soluções numéricas foram desenvolvidas para a resolução desses modelos (LIAPIS; LITCHFIELD, 1979b; FERGUSON; LEWIS, 1993). Elas envolvem equações diferenciais parciais e sua resolução consiste na discretização temporal das variáveis por meio de diversos métodos.

A validação de um processo de liofilização envolve a análise dos parâmetros de processo e a análise das características do produto. O controle dos parâmetros dependentes, tais como a temperatura do produto, a taxa de sublimação e o tempo de liofilização, e um entendimento de como eles estão relacionados às variáveis programáveis é essencial porque os parâmetros dependentes afetam as propriedades do produto. Sendo assim, a modelagem matemática do processo de liofilização de um determinado produto também é muito útil no estudo da validação do processo, pois ela permite examinar o impacto das variáveis programáveis sobre os parâmetros dependentes do processo.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de um modelo matemático capaz de descrever a dinâmica do processo de liofilização do pericárdio bovino. Foram estudadas as propriedades termodinâmicas e estruturais do produto congelado, os efeitos dos parâmetros programáveis da liofilização sobre as variáveis dependentes do processo e o efeito das variáveis dependentes do processo sobre as características reológicas do produto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Matéria prima

O pericárdio bovino foi obtido de um frigorífico local, onde foi limpo para remoção de gordura e sujidades, e transportado ao laboratório em solução salina (0,9%), refrigerada, para uma limpeza mais refinada, com a remoção de restos de gordura, vasos, sangue, etc. O tecido foi então imerso em solução de glicerina até o início das análises.

O processo de reticulação do pericárdio bovino foi feito mantendo-se o produto imerso em solução de glutaraldeído (0,5%) em solução tampão fosfato (pH 7,4) a 4°C por dez dias. Após a reticulação, o pericárdio foi conservado em solução de formaldeído (4%).

Antes de cada análise as amostras foram lavadas em solução salina (0,9%) sob constante agitação durante 15 minutos por 5 vezes.

3.1.2 Equipamentos

- Liofilizador Microprocessado, FTS Systems, dotado de central de controle, bomba de vácuo, extrator de amostras, analisador do ponto de orvalho e sistema de fechamento de amostras (FIGURA 02);
- Espectrofotômetro da marca HunterLab, modelo UltraScanTMXE (FIGURA 03);

Figura 02. Liofilizador FTS Systems.

Figura 03. Espectrofotômetro HunterLab.

- Analisador de umidade Vapor PRO, Computrec. (FIGURA 04);

Figura 04. Equipamento Vapor PRO.

- Analisador dinâmico mecânico, DMA 242 Cell da marca NETZSCH (FIGURA 05);

Figura 05. Analisador dinâmico mecânico NETZSCH.

- Texturômetro TA-XT2, Stable Microsystem (FIGURA 06), equipado com pinças como pontas de prova (FIGURA 07A), para a realização dos testes de tração e um dispositivo composto por um *probe* em forma de agulha com uma ponta esférica (5 mm de diâmetro) e um suporte que prende a amostra entre duas placas, para os testes de punção (FIGURA 07B);

Figura 06. Texturômetro TA-XT2.

Figura 07. A) Acessório para testes de tração; B) Acessório para testes de punção.

- Microscópio eletrônico de varredura JEOL Ltda, modelo JSM-7401F, (FIGURA 08);

Figura 08. Microscópio eletrônico de varredura JEOL.

- Microscópio óptico acoplado à liofilização LYOSTAT Cryostage (FDCS 196, Linkam Scientific Instruments, Surrey, U.K.), equipado com sistema de refrigeração com nitrogênio líquido (LNP94/2, Linkam), controlador de temperatura (TMS94, Linkam), bomba de vácuo (Edwards E2M1.5, Linkam), microscópio polarizado Nikon Elipse E600 (Nikon, Japan) e câmera (Imasys, Suresnes, France), para a visualização e caracterização do processo de liofilização (FIGURA 09).

Figura 09. Equipamento LYOSTAT.

3.2 Métodos

3.2.1 Congelamento e liofilização

A liofilização foi feita em um liofilizador FTS Systems. Amostras redondas de 3cm de diâmetro foram colocadas em placas de Petri e submetidas a congelamento lento (1,5°C/min) até que a temperatura do produto atingisse -50°C e a congelamento rápido (30°C/min) por imersão em nitrogênio líquido. O tratamento térmico *annealing* foi aplicado submetendo-se primeiramente as amostras ao congelamento (lento e rápido). As amostras foram aquecidas até -20°C e mantidas a essa temperatura por 1 hora. Finalmente, as amostras foram novamente congeladas a -50°C e submetidas a liofilização. A secagem primária foi conduzida em uma temperatura de placa de -5°C e pressão de 160mTorr. Na secagem secundária, a temperatura de placa foi de 25°C, sob a mesma pressão. O tempo de liofilização foi considerado da estabilização da pressão da câmara até a confirmação dada pela queda dos valores de temperatura de ponto de orvalho (*dew Point*).

As amostras liofilizadas foram reidratadas em solução salina (0,9%) a temperatura de 25°C.

3.2.2 Avaliação da cor

As amostras antes de serem liofilizadas e após a reidratação foram analisadas quanto à refletância (L^* , a^* , b^*).

No Sistema L^* , a^* , b^* , o grau de luminosidade é representado pelo valor de L^* ; o vermelho por valores positivos de a^* ; verde por valores negativos de a^* ; amarelo por valores positivos de b^* e o azul por valores negativos de b^* (GULLET; FRANCIS; CLYDESDALE, 1972; CLYDESDALE, 1984).

3.2.3 Conteúdo de umidade residual

A análise da umidade do produto foi feita no equipamento Vapor PRO. Este instrumento aquece uma amostra contida em um frasco. A umidade contida na amostra é arrastada por uma corrente de gás seco através de um sensor de umidade, que integra o sinal de variação de umidade e converte em porcentagem de umidade. Pedacos de amostras foram pesados em frascos próprios do equipamento e submetidos à análise. Os dados obtidos apresentam-se na forma de % de umidade.

3.2.4 Testes de Tração

Os testes de tração foram realizados em texturômetro com base na norma ASTM D638. Os testes foram feitos com 50 amostras, cortadas aleatoriamente, no formato da Figura 10. As espessuras das amostras foram medidas com um micrômetro digital em três pontos do centro de cada amostra.

Figura 10. Medidas do corpo de prova para testes de tração, em mm.

Os parâmetros utilizados foram:

- Velocidade da fase pré-teste: 0,2mm/s;
- Velocidade da fase teste: 0,2mm/s;
- Velocidade da fase pós-teste: 10mm/s;
- Distância: 150mm.

O equipamento fornece a curva obtida (força x deslocamento). Os dados obtidos foram analisados em um programa desenvolvido no software MATLAB (Math works, Inc – USA) que transforma a curva em tensão versus deformação e calcula os valores de tensão de ruptura (σ_{rup}), a área da seção transversal das amostras (A), o coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e o módulo de Young (E).

3.2.5 Ensaios de Punção

Os testes de punção foram realizados em texturômetro, com base na norma ASTM D5748, em 50 amostras. Amostras de 3 x 3 cm foram colocadas entre duas placas de alumínio e fixadas em um suporte, cujas medidas apresentam-se na Figura 11. Utilizou-se um *probe* esférico de 5 mm de diâmetro. As espessuras das amostras foram medidas com um micrômetro digital.

Figura 11. Medidas do acessório utilizado nos testes de punção, em cm.

Os parâmetros utilizados foram:

- Velocidade da fase pré-teste: 1,0 mm/s;
- Velocidade da fase teste: 0,2 mm/s;
- Velocidade da fase pós-teste: 2,0 mm/s;

- Distância: 25 mm.

O equipamento fornece a curva obtida (força x deslocamento). A força até a perfuração da amostra (F), o deslocamento máximo do filme (D) e a área sob a curva (A_{SC}) foram determinados.

3.2.6 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)

Na análise dinâmico mecânica, 50 amostras foram submetidas à compressão com frequências de 0,1; 0,5; 1; 5 e 10Hz e amplitude constante de 60 μ m. Os testes foram realizados à temperatura ambiente.

As amostras de pericárdio bovino frescas e liofilizadas e reidratadas foram cortadas, apresentando seção reta de aproximadamente 1 x 1 cm e espessura próxima de 300 μ m.

Esta análise fornece o módulo de armazenamento, E' , o módulo de perda, E'' , e a sua relação, $\tan \delta$. Analisaram-se somente os dados de E'' , já que é o parâmetro que caracteriza o comportamento mecânico do produto.

3.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras liofilizadas foram analisadas lateralmente e na sua superfície lisa e rugosa, em microscópio eletrônico de varredura, com detector LEI, à 2,0kV e aumento de 500 vezes.

As amostras foram fixadas em suportes, com fita adesiva metálica dupla face, e recobertas com ouro para melhor visualização. Esta análise permite a verificação de possíveis alterações na estrutura das amostras.

3.2.8 Microscopia óptica acoplada à liofilização

O pericárdio foi submetido à microscopia óptica acoplada a liofilização utilizando o equipamento Lyostat. As amostras de 3mm de diâmetro foram colocadas entre duas lâminas de vidro e submetidas a congelamento lento com

annealing (resfriadas até -50°C , mantidas a -20°C por uma hora e resfriadas novamente até -50°C).

Os parâmetros de liofilização utilizados foram:

- Taxas de aquecimento da placa: $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $8,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $15,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$;
- Pressões da câmara: 160mTorr, 320mTorr e 480mTorr.

As taxas de sublimação (N_t) foram determinadas medindo-se as espessuras das camadas secas das amostras a cada minuto.

3.2.9 Modelagem matemática

A modelagem matemática da liofilização do pericárdio bovino baseou-se no modelo proposto por Liapis; Litchfield (1979a). As seguintes considerações foram feitas para o seu desenvolvimento:

- os fluxos de calor e massa ocorrem em uma única direção, normal à interface;
- a sublimação ocorre em uma interface paralela à superfície da amostra e à uma distância X ;
- a espessura da interface é considerada infinitesimal;
- vapor de água e gás inerte ocupa o espaço livre dos poros da camada seca;
- na interface, a concentração de vapor de água está em equilíbrio com o gelo;
- na camada seca, a matriz sólida e a fase gasosa estão em equilíbrio térmico;
- a camada congelada é considerada homogênea com condutividade térmica, densidade e calor específico uniformes;
- as laterais e o fundo da camada estão em perfeito isolamento contra a transferência de calor e massa.

As taxas de sublimação (N_t) foram calculada com dados obtidos de microscopia óptica acoplada à liofilização. A densidade do pericárdio bovino (ρ) foi medida utilizando um picnômetro e uma balança digital. A porosidade (n) foi determinada utilizando-se o equipamento Hidrosorb 1000 (Quantachrome Instruments). As propriedades térmicas foram medidas utilizando-se um DSC-50 Cell (Shimadzu).

A solução numérica do modelo foi feita utilizando-se o programa MATHCAD 13.0 (PTC, USA), que se baseia no método das linhas para a resolução das equações diferenciais parciais (SCHIESSER, 1991).

3.2.10 Análise estatística

Os dados foram expressos pelos valores de suas médias e seus desvios-padrão. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o Teste t . O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência da taxa de congelamento na liofilização do pericárdio bovino

A liofilização do pericárdio bovino foi conduzida a uma temperatura de placa de -5°C e pressão de câmara de 160mTorr baseados nos estudos de análise térmica do material por DSC e microscopia óptica acoplada à liofilização (BORGOGNONI *et al.*, 2009). Nessas condições de processo, observou-se que o produto apresenta manutenção da estrutura das fibras de colágeno sem indicar alteração na estrutura secundária da proteína.

As Figuras 12 a 15 apresentam curvas de liofilização do pericárdio bovino submetido a diferentes protocolos de congelamento, com seus respectivos tempos de liofilização. As curvas mostram dados de temperatura de placa, temperatura de produto, temperatura de ponto de orvalho e pressão da câmara.

Figura 12. Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento lento (tempo de liofilização: aproximadamente 10 horas).

Figura 13. Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento rápido (tempo de liofilização: aproximadamente 4 horas).

Figura 14. Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento lento com *annealing* (tempo de liofilização: aproximadamente 4 horas e 30 minutos).

Figura 15. Curva de liofilização do pericárdio bovino utilizando congelamento rápido com *annealing* (tempo de liofilização: aproximadamente 6 horas).

Pode-se observar as diferenças nos tempos de liofilização utilizando diferentes protocolos de congelamento.

A seta 1 indica nas figuras o ponto de cristalização da água no produto. A temperatura de cristalização determinada durante o congelamento lento apresentou-se em torno de -13°C . Este dado está de acordo com o valor obtido por Tattini-Jr (2008), que determinou a temperatura de cristalização da água no pericárdio bovino por calorimetria exploratória diferencial.

Os dados de temperatura de ponto de orvalho (*dew point*) indicam o final da secagem. Inicialmente seu valor permanece em 23°C e conforme o teor de umidade do produto abaixa, seu valor também abaixa. Verificou-se que a liofilização utilizando-se congelamento lento sem *annealing* foi a única que apresentou um aumento de temperatura de ponto de orvalho, após o aumento da temperatura da placa. Isso representa a secagem secundária no qual a água fortemente ligada ao produto é removida. Provavelmente, esse comportamento, somente neste protocolo de congelamento, se deve a grande quantidade de água na matriz vítrea formada entre os cristais de gelo na região intersticial quando comparada às outras curvas de liofilização.

O *annealing* foi responsável pela diminuição do tempo de liofilização das amostras submetidas ao congelamento lento e pelo aumento do tempo de liofilização das amostras submetidas ao congelamento rápido. Aparentemente, o tratamento térmico reduziu o tempo de liofilização devido ao aumento do tamanho e da mudança da distribuição dos cristais de gelo. As mudanças na região intersticial da matriz congelada alteram a taxa de sublimação do material (SEARLES; CARPENTIER; RANDOLPH, 2001).

A Tabela 01 mostra a quantidade de umidade residual do pericárdio bovino liofilizado submetido aos diferentes protocolos de congelamento. Observou-se que as amostras submetidas ao congelamento lento, com ou sem *annealing*, apresentaram menores resultados de umidade residual (6%) do que as amostras submetidas a congelamento rápido, com ou sem *annealing* (8 a 10%).

Tabela 01. Umidade residual das amostras liofilizadas submetidas a diferentes protocolos de congelamento.

Umidade Residual (%)			
Congelamento lento	Congelamento lento com <i>annealing</i>	Congelamento rápido	Congelamento rápido com <i>annealing</i>
6,64 ± 0,42	6,54 ± 0,28	8,67 ± 0,32	9,47 ± 0,42

n=10

Além disso, resultados obtidos por Borgognoni *et al.* (2009) mostraram, através de análises de espectroscopia Raman do pericárdio bovino, que amostras submetidas ao congelamento lento com *annealing* também mantiveram sua estrutura após o processo de liofilização.

Mesmo utilizando parâmetros de liofilização acima da temperatura de transição vítrea do produto, não foi observado nenhum sinal de colapso, mostrando que o pericárdio bovino apresenta suporte físico suficiente para evitar o colapso nessas condições de liofilização.

4.2 Efeito da liofilização nas propriedades físicas do pericárdio bovino

Amostras de pericárdio bovino, tratadas e não tratadas com glutaraldeído, foram analisadas quanto à manutenção das suas propriedades físicas após o processo de liofilização.

As amostras tratadas (PBT) e não tratadas (PB) foram comparadas às amostras liofilizadas e reidratadas tratadas (PBTL) e não tratadas (PBL).

4.2.1 Colorimetria

A cor é um parâmetro que pode ser medido para verificar alterações no produto devido ao seu processamento (AYROSA; PITOMBO, 2000; LIMA, 2004).

Os resultados de colorimetria das amostras de pericárdio bovino, representados por valores de L^* , a^* e b^* , apresentam-se na Tabela 02. Os dados completos apresentam-se nas Tabelas 11 a 14 do Apêndice I.

Tabela 02. Dados de colorimetria das amostras de pericárdio bovino analisadas.

	Média L^*	Média a^*	Media b^*
PB	85,21 ± 1,42	-1,69 ± 0,18	13,98 ± 2,44
PBT	74,14 ± 2,13	3,45 ± 1,69	46,28 ± 1,88
PBL	84,97 ± 1,34	-1,80 ± 0,24	14,71 ± 2,33
PBTL	73,43 ± 2,12	3,72 ± 1,23	45,62 ± 2,12

n=50

Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de L^* , a^* e b^* das amostras frescas e reidratadas ($p>0,05$). Sendo assim, a liofilização não alterou a intensidade da cor das amostras de pericárdio bovino.

Além disso, pode-se observar que o processo de reticulação altera os valores de L^* , a^* e b^* do pericárdio bovino. Os valores positivos de a^* mostram que amostras tratadas apresentam intensidade da cor vermelha e os valores altos de b^* indicam grande intensidade na cor amarela. Essa diferença na coloração também é perceptível a olho nu (FIGURA 16).

Figura 16. Pericárdio bovino fresco sem tratamento (A) e pericárdio bovino fresco reticulado com glutaraldeído (B).

O glutaraldeído é uma molécula bifuncional, isto é, capaz de reagir em dois pontos de sua cadeia devido à presença de grupos aldeídos terminais livres. No processo de reticulação, o glutaraldeído interage com os aminogrupos do colágeno, que constitui a estrutura do pericárdio bovino, e se liga a dois pontos da mesma molécula ou de moléculas diferentes, formando ligações cruzadas, as bases de Schiff, que possuem coloração amarelada (FIGURA 17).

Figura 17. Representação das ligações cruzadas entre moléculas de colágeno e glutaraldeído.

4.2.2 Conteúdo de umidade residual

Os valores de umidade residual das amostras liofilizadas de pericárdio bovino apresentam-se na Tabela 03.

Tabela 03. Umidade residual das amostras de pericárdio bovino analisadas.

Umidade Residual (%)	
PB	81,73 ± 1,29
PBT	76,77 ± 1,58
PBL	6,54 ± 0,28
PBTL	9,67 ± 2,71

n=10

Comparando-se os dados, verificou-se uma diferença significativa nos teores de umidade das amostras frescas, tratadas e não tratadas com glutaraldeído ($p < 0,05$).

O processo de reticulação com glutaraldeído do pericárdio bovino faz com que o glutaraldeído ocupe sítios que antes eram ocupados pela água, excluindo parte da água da estrutura do colágeno. Sung *et al.* (1999) verificou este fato em seu estudo.

Ao mesmo tempo as ligações feitas pelo glutaraldeído na estrutura do pericárdio dificultam a remoção da água intersticial da amostra. Devido a isso, as amostras de pericárdio bovino tratadas, liofilizadas e reidratadas, apresentaram valores de umidade maiores que as amostras, liofilizadas e reidratadas, de pericárdio bovino sem tratamento.

4.2.3 Testes de tração

O teste de tração permite avaliar a elasticidade e a resistência de uma amostra quando submetida a uma força de tração. Neste teste, a amostra sofre um deslocamento e, conseqüentemente, um incremento (Δl) no seu comprimento, l , como mostra a Figura 18. A deformação (ϵ_T) é a razão entre o deslocamento e o tamanho original da amostra.

Figura 18. Representação da deformação sofrida pela amostra durante o teste de tração.

Os gráficos típicos obtidos para ensaios com cada tipo de amostra, que relacionam força e deslocamento, apresentam-se nas Figuras 19A-22A. A partir dos dados, o programa MATLAB traça as curvas de tensão versus deformação (FIGURA 19B-22B).

Figura 19. A) Gráfico de força versus deslocamento de PB, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PB, obtido pelo programa MATLAB.

Figura 20. A) Gráfico de força versus deslocamento de PBT, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PBT, obtido pelo programa MATLAB.

Figura 21. A) Gráfico de força versus deslocamento de PBL, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PBL, obtido pelo programa MATLAB.

Figura 22. A) Gráfico de força versus deslocamento de PBTL, obtido no ensaio de tração; B) Gráfico de tensão versus deformação de PBTL, obtido pelo programa MATLAB.

Pode-se observar, nas curvas obtidas pelo programa, uma região linear na qual a tensão é proporcional à deformação. A constante de proporcionalidade entre essas duas grandezas indica a elasticidade do produto. O módulo de Young, ou módulo de elasticidade em ensaios de tração, é obtido a partir do coeficiente angular da região linear da curva.

O programa também calcula os valores de tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), do coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e do módulo de Young (E).

A Tabela 04 apresenta os valores médios obtidos das amostras testadas e seus respectivos desvios padrão. As Figuras 23 e 24 mostram os valores de elasticidade e tensão de ruptura das amostras testadas, respectivamente. Os dados completos apresentam-se na Tabela 15 a 18 do Apêndice II.

Tabela 04. Dados obtidos nos ensaios de tração das amostras de pericárdio bovino analisadas.

	PB	PBT	PBL	PBTL
E (kgf/mm²)	7,79 ± 2,91	12,70 ± 5,19	8,89 ± 3,58	13,60 ± 5,81
σ_{rup} (kgf/mm²)	1,68 ± 0,55	2,89 ± 1,15	1,87 ± 0,73	3,03 ± 1,79
ϵ_T (%)	40,70 ± 6,65	37,50 ± 4,61	41,10 ± 7,46	38,90 ± 4,82
A (mm²)	0,76 ± 0,19	0,91 ± 0,23	0,72 ± 0,18	0,79 ± 0,23
R²	0,99 ± 0,00	0,99 ± 0,01	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

n=50

Figura 23. Valores de elasticidade do pericárdio bovino sem tratamento (PB) e do pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído (PBT), antes e após a liofilização, obtidos por ensaios de tração.

Figura 24. Valores de tensão de ruptura do pericárdio bovino sem tratamento (PB) e do pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído (PBT), antes e após a liofilização.

Os valores de elasticidade, tensão de ruptura e deformação das amostras de pericárdio bovino tratado e não tratado, antes e após a liofilização, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Esses resultados estão de acordo com os verificados, por meio de ensaios de tração, por Maizato (2003) e Hafeez *et al.* (2005) que observaram que a liofilização não alterou de forma significativa as características mecânicas do pericárdio bovino.

Pôde-se observar que a reticulação com glutaraldeído aumenta significativamente a elasticidade do tecido, como já comprovado anteriormente em diversos estudos, já que o glutaraldeído tem a capacidade de fazer ligações cruzadas (VAN NOORT *et al.*, 1982; LANGON *et al.*, 1999; SUNG *et al.*, 1999).

Os desvios-padrão das amostras apresentaram-se muito altos, pois o pericárdio é um tecido anisotrópico, o que faz com que a direção em que a amostra é cortada altere o resultado final (ZIOUPUS; BARBENEL, 1994; SUN *et al.*, 2003). Devido a isso, outros testes mecânicos foram feitos para a

verificação do comportamento mecânico do pericárdio bovino após ser submetido a outros esforços.

4.2.4 Ensaio de Punção

As propriedades de punção de uma membrana estão relacionadas à rigidez do material (RADEBAUGH *et al.*, 1988). O teste de punção determina a resistência do material à penetração.

No teste de punção, a amostra sofre um deslocamento (D) e, conseqüentemente, um incremento (Δl) no seu raio (r) como mostra a Figura 25.

Figura 25. Representação da deformação sofrida pela amostra durante o teste de punção.

Pode-se verificar que o incremento no raio das amostras submetidas a ensaios de punção não é obtido diretamente como nos ensaios de tração. Obtém-se esse valor por meio da aplicação algébrica do teorema de Pitágoras no triângulo reto mostrado na Figura 25.

Os gráficos típicos obtidos nos ensaios com cada tipo de amostra, que relacionam força e deslocamento, apresentam-se na Figura 26. A força até a perfuração da amostra (F), o deslocamento máximo do filme (D) e a área sob a curva (A_{sc}), relacionada à energia de punção (ΔE_{punc}) foram determinados pelo programa do equipamento.

Os dados foram convertidos em tensão de punção (σ_{punc}) e deformação à punção (ε_p), utilizando as seguintes equações:

$$\sigma_{punc} = \frac{F}{A}$$

$$\varepsilon_p = \frac{\Delta l}{r} = \frac{\sqrt{r^2 + D^2} - r}{r} * 100$$

$$\Delta E_{punc} = A_{SC}$$

em que A é a área da secção transversal da amostra no orifício cilíndrico do dispositivo que a segura.

Figura 26. Gráficos de força versus deslocamento das amostras de pericárdio bovino analisadas, obtidos em ensaios de punção.

Os gráficos típicos de tensão de punção versus deformação à punção das amostras de pericárdio bovino analisadas apresentam-se na Figura 27.

Figura 27. Gráficos de tensão versus deformação das amostras de pericárdio bovino analisadas, obtidos em ensaio de punção.

A Tabela 05 mostra os valores de tensão, deformação e energia de punção das amostras testadas e seus respectivos desvios padrão. Os dados completos apresentam-se na Tabela 19 a 22 do Apêndice III.

Tabela 05. Dados obtidos nos ensaios de punção das amostras de pericárdio bovino analisadas.

	$\sigma_{\text{punc}} \text{ (kgf/mm}^2\text{)}$	$\epsilon_p \text{ (\%)}$	$\Delta E_{\text{punc}} \text{ (kgf.mm)}$
PB	$5,69 \pm 2,03$	$119,70 \pm 39,49$	$28,11 \pm 13,14$
PBT	$7,52 \pm 2,38$	$52,77 \pm 10,21$	$32,26 \pm 10,29$
PBL	$6,34 \pm 2,37$	$124,84 \pm 19,66$	$28,69 \pm 12,72$
PBTL	$8,23 \pm 2,48$	$51,75 \pm 11,00$	$34,80 \pm 11,18$

n=50

Os valores de tensão à punção, deformação e energia de punção das amostras de pericárdio bovino tratado e não tratado, antes e após a liofilização, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$).

As amostras de pericárdio bovino tratado mostraram maior resistência à punção, absorvendo mais energia ao resistir à punção quando comparadas as amostras de pericárdio bovino sem tratamento. Entretanto, as amostras de pericárdio bovino sem tratamento apresentaram maior percentual de deformação quando comparadas às amostras de pericárdio tratado, isto é, apresentaram maior alongamento à punção ($p<0,05$).

Radebaugh *et al.*, (1988) disseram que a natureza do teste de punção não permite o cálculo do módulo de Young. Esta afirmação é coerente, pois em ensaios de tração mede-se a força necessária para tensionar o produto até seu rompimento, já em ensaios de punção mede-se a força necessária para comprimir o produto até sua perfuração. Mas outros autores consideram possível a determinação de um módulo elástico através de análises de punção, pois através desses ensaios consegue-se obter a curva de tensão versus deformação, necessária para a determinação deste módulo (BODMEIER; PAERATAKUL, 1993; BUSSEMER; PEPPAS; BODMEIER, 2003).

Neste trabalho, foi calculado o módulo de Young por meio de testes de tração e um outro módulo elástico, denominado E_{punc} , por meio da análise da região linear da curva de tensão versus deformação obtidas em testes de punção, já que os ensaios determinam diferentes tipos de deformações no produto quando submetido a determinadas forças.

Os dados de E_{punc} , para as amostras tratadas e não tratadas, antes e após o processo de liofilização apresentam-se na Tabela 06 e estão representados graficamente na Figura 28.

Tabela 06. Dados de elasticidade à punção das amostras de pericárdio bovino analisadas.

	$E_{\text{punc}} \text{ (kgf/mm}^2\text{)}$
PB	$10,53 \pm 3,50$
PBT	$17,37 \pm 6,26$
PBL	$12,28 \pm 3,99$
PBTL	$18,01 \pm 5,85$

n=50

Figura 28. Valores de elasticidade do pericárdio bovino sem tratamento (PB) e do pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído (PBT), antes e após a liofilização, obtidos por ensaios de punção.

As amostras de pericárdio bovino tratadas apresentaram os mesmos valores de módulos de elasticidade à punção ($p>0,05$) antes e após a liofilização. Entretanto, a liofilização aumentou significativamente a elasticidade à punção das amostras de pericárdio bovino sem tratamento ($p<0,05$).

Os testes de punção, assim como os testes de tração, mostraram que a reticulação com glutaraldeído aumenta significativamente a elasticidade do tecido ($p<0,05$).

Além disso, os valores de tensão e elasticidade obtidos pelos ensaios de punção apresentaram-se maiores do que os obtidos pelo ensaio de tração, mostrando que as amostras necessitam de maiores valores de tensão para a punção do que para a tração. Isso deve-se ao fato de que nos ensaios de tração a força é aplicada uniaxialmente ao longo do eixo da amostras, enquanto em ensaios de punção o estiramento que a amostra sofre é biaxial.

4.2.5 Análise dinâmico mecânica (DMA)

A análise dinâmico mecânica consiste na aplicação de uma tensão ou deformação mecânica oscilatória, normalmente senoidal, de baixa amplitude a um sólido ou líquido viscoso, medindo-se a deformação sofrida por ele sob variação de frequência ou de temperatura.

A análise fornece valores de módulo de armazenamento (E'), que está relacionado à quantidade de energia armazenada pelo material durante um ciclo, mostrando seu comportamento elástico.

A Figura 29 mostra os valores de módulo de armazenamento (E') das amostras de pericárdio bovino tratadas e não tratadas, antes e após a liofilização, em função das frequências.

Figura 29. Módulos de armazenamento em função da frequência de amostras de pericárdio bovino.

Os valores de módulo de armazenamento das amostras tratadas e não tratadas, antes da liofilização, apresentaram-se diferentes. Isso indica uma variação nas propriedades elásticas do produto após seu tratamento. Os valores de E' para amostras tratadas são menores, demonstrando maior elasticidade do material, o que já era previsto.

Verifica-se também que as amostras tratadas não apresentaram diferença significativa nos valores de E' antes e após a liofilização ($p > 0,05$). Já as amostras não tratadas apresentaram valores menores de E' após a liofilização ($p < 0,05$). Esse resultado vem ao encontro dos resultados obtidos nos ensaios de punção que apresentaram a manutenção da propriedade elástica do pericárdio bovino tratado e um aumento da elasticidade de amostras não tratadas após a liofilização.

Os resultados obtidos pelos três métodos de avaliação das características mecânicas do pericárdio bovino indicam que a liofilização não alterou significativamente as propriedades do pericárdio bovino reticulado com glutaraldeído. Entretanto, ensaios de punção e de DMA revelaram que a liofilização foi responsável, respectivamente, pelo aumento da elasticidade à punção e pela diminuição do módulo de armazenamento do pericárdio bovino sem tratamento.

4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As Figuras 30 e 31 apresentam fotografias das amostras de pericárdio bovino obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura.

Amostras de pericárdio bovino, tratadas e não tratadas, foram secas em estufa (30°C), simulando um processo de evaporação natural, para que sua estrutura se colapsasse. Essas amostras e amostras de pericárdio bovino liofilizadas, tratadas e não tratadas, foram submetidas a análise de MEV para se observar as diferenças entre elas.

Pode-se observar que as amostras de pericárdio bovino liofilizadas, sem tratamento (FIGURAS 30A e 30B), apresentam características diferentes de suas superfícies lisa e rugosa quando comparadas às amostras de pericárdio bovino liofilizadas, tratadas com glutaraldeído (FIGURAS 30E e 30F).

As Figuras 30C e D e 30G e H, que apresentam fotografias das superfícies lisa e rugosa das amostras de pericárdio bovino não tratadas e tratadas, respectivamente, após serem secas sem controle, apresentam um emaranhado de fibras, caracterizando superfícies de amostras que sofreram colapso estrutural.

As Figuras 31B e 31F mostram fotografias de amostras de pericárdio bovino liofilizadas, não tratadas e tratadas, respectivamente, vistas lateralmente. E as Figuras 31D e 31H apresentam fotografias laterais do mesmo tipo de amostras, secas sem controle. Verifica-se a presença de poros nas amostras liofilizadas e a ausência de porosidade nas amostras que sofreram colapso estrutural.

Com isso, pôde-se verificar que o pericárdio bovino, com ou sem tratamento, mantém sua estrutura após o processo de liofilização, mesmo utilizando parâmetros de liofilização acima da temperatura de transição vítrea do produto.

Figura 30. Fotografias de MEV das superfícies lisas (lado esquerdo) e rugosas (lado direito) do pericárdio bovino. (A, B) sem tratamento e liofilizado, (C, D) sem tratamento e colapsado, (E, F) reticulado com glutaraldeído e liofilizado, (G, H) reticulado com glutaraldeído e colapsado.

Figura 31. Fotografias de MEV da superfície rugosa (lado esquerdo) e da lateral (lado direito) do pericárdio bovino. (A, B) sem tratamento e liofilizado, (C, D) sem tratamento e colapsado, (E, F) reticulado com glutaraldeído e liofilizado, (G, H) reticulado com glutaraldeído e colapsado.

4.3 Modelagem matemática da liofilização do pericárdio bovino

Como foi observado anteriormente, o congelamento lento com *annealing* na liofilização do pericárdio bovino foi responsável por manter as características do produto liofilizado e por determinar um baixo tempo de liofilização, não apresentando a etapa de secagem secundária. Sendo assim, apresentaremos o estudo da modelagem matemática da etapa primária do processo.

A Figura 32 apresenta imagens da liofilização do pericárdio bovino obtidas pelo equipamento LYOSTAT. Observa-se a liofilização ocorrendo no sentido das bordas para o centro da amostra e a formação da interface de sublimação entre as camadas seca e congelada.

Figura 32. Fotos do pericárdio bovino obtidas por microscopia óptica acoplada à liofilização. Secagem primária: (A) 25 minutos, (B) 30 minutos, (C) 45 minutos e (D) 50 minutos.

O esquema considerado pelos autores Liapis; Litchfield (1979a), para a resolução do modelo matemático (FIGURA 33A), representa a liofilização de produtos em prateleiras, em que uma única superfície é exposta ao ambiente, com as outras cinco sendo mantidas isoladas termicamente.

A liofilização do pericárdio bovino ocorrerá somente no plano xy, já que as superfícies superior e inferior do material também foram isoladas como no trabalho de Liapis; Litchfield (1979a) (FIGURA 33B).

Figura 33. (A) Formato da amostra considerada por Liapis; Litchfield (1979a); (B) Formato da amostra no presente estudo.

A Figura 34 mostra o esquema considerado neste estudo para a resolução do modelo matemático.

A liofilização é um processo simultâneo de transferência de calor e massa. Os fluxos de massa (N_t) e de calor (q) em uma liofilização percorrem o mesmo caminho (a camada seca), mas em sentidos opostos.

Figura 34. Esquema do sistema considerado para modelagem matemática.

Na Figura 34, x é a posição da interface de sublimação, L é o raio da amostra, I é o índice que representa a camada seca e II é o índice que representa a camada congelada. O fluxo de massa, N_t , também é denominado taxa de secagem ou taxa de sublimação.

O vapor de água resultante da sublimação na interface de sublimação percorre a camada seca, entra na câmara de liofilização e re-sublima no condensador. A interface de sublimação se movimenta da superfície ($x=0$) até o centro da amostra ($x=L$).

O modelo matemático consiste de balanços de energia, no estado de não-equilíbrio, nas camadas seca e congelada, e de balanços de energia e massa na interface do produto, descritos nas equações 1 a 4:

$$\frac{\partial T_I}{\partial t} = -\frac{N_t c_{pv}}{\rho_I c_{pl}} \frac{\partial(T_I)}{\partial x} + \alpha_I \frac{\partial^2 T_I}{\partial x^2}, \text{ para } 0 \leq x \leq X \quad (1)$$

$$\frac{\partial T_{II}}{\partial x} = \alpha_{II} \left(\frac{\partial^2 T_{II}}{\partial x^2} \right), \text{ para } X \leq x \leq L \quad (2)$$

$$-k_I \frac{\partial T_I}{\partial x} = \Delta H_s N_t, \text{ para } x=X \quad (3)$$

$$N_t = -n \rho_{II} \frac{\partial X}{\partial t} \quad (4)$$

O primeiro termo da equação 1 é negativo, pois a variação do calor flui de uma região mais quente para uma mais fria, e o segundo termo corresponde à variação do gradiente de temperatura.

As condições iniciais e de contorno utilizadas na resolução do modelo apresentam-se nas equações 5 a 10. Os dados de temperatura serão apresentados na unidade kelvin (unidade básica do Sistema Internacional de Unidades) para que os gráficos obtidos sejam mostrados no primeiro quadrante do plano xy .

$$T_I = T_{II} = T_0, \text{ para } t=0 \text{ e } 0 \leq x \leq L \quad (5)$$

$$q = -k_I \frac{\partial T_I}{\partial x}, \text{ para } x=0 \text{ e } t>0 \quad (6)$$

$$q = \sigma F (T_p^4 - T_I^4), \text{ para } x=0 \text{ e } t>0 \quad (7)$$

$$T_I = T_H = T_X = \frac{\ln(P)}{0,0955} + 178,1, \text{ para } x=X \text{ e } t>0 \quad (8)$$

$$T_p = 223 + \Delta t, \text{ para } x=0 \text{ e } 0 \leq t \leq t_M, \text{ onde } t_M = \frac{45}{\Delta} \quad (9)$$

$$T_p = 268, \text{ para } x=0 \text{ e } t > t_M \quad (10)$$

O congelamento é a primeira etapa do processo de liofilização. Sendo assim, a condição inicial de temperatura é a temperatura de congelamento do produto (Equação 5). As equações 6 e 7 mostram que a transferência de calor durante a sublimação ocorre principalmente por radiação até a superfície do produto e por condução através da camada seca. Os dados que relacionam a pressão de vapor do gelo com a temperatura foram aproximados exponencialmente e a equação exponencial obtida foi invertida para a determinação da temperatura do produto em função da pressão da câmara (Equação 8). A temperatura da placa do liofilizador foi elevada sob determinadas taxas de aquecimento até um valor final mantido constante (Equações 9 e 10).

A determinação da taxa de sublimação foi feita por microscopia óptica acoplada à liofilização. Através da observação visual da liofilização do pericárdio bovino no equipamento LYOSTAT obtiveram-se os dados da Figura 35, que mostra a variação da espessura da camada seca ao longo do tempo, nas diferentes condições de pressão da câmara e taxa de aquecimento da placa. Os dados obtidos foram aproximados por splines cúbicos. Os coeficientes de correlação de todas as curvas apresentaram-se em torno de 0,998.

A fim de verificar a variação do tempo de liofilização com o tamanho das amostras, o pericárdio bovino foi cortado em outros 3 diâmetros diferentes (FIGURA 36). As amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de

microscopia óptica acoplada à liofilização, nas condições de 160mTorr e 1,5°C/min, e os tempos de liofilização foram determinados (TABELA 07). Somente os tempos finais de liofilização foram calculados, pois o microscópio permite a observação de, no máximo, 2mm de amostra.

Figura 35. Espessuras da camada seca ao longo do tempo de liofilização.

Figura 36. Amostras de pericárdio bovino de diâmetros 1,5mm (A), 3,0mm (B), 4,5mm (C) e 6,0mm (D).

Tabela 07. Tempo de liofilização de amostras de diferentes tamanhos, sob pressão de 160mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Diâmetro (mm)	Tempo de liofilização (s)
1,5	1.320
3,0	1.860
4,5	2.220
6,0	3.060

Verificou-se que os tempos de liofilização praticamente seguiram as tendências das linhas que modelam os dados da Figura 35. Sendo assim, pode-se concluir que a obtenção da taxa de sublimação, em uma determinada condição de liofilização, com a análise de apenas um tamanho de amostra é representativa.

A velocidade com que a camada seca cresce ao longo do tempo de liofilização, ou seja, a velocidade da interface de sublimação foi determinada pela derivação dos dados de espessura da camada seca ao longo do tempo (FIGURA 37). Pode-se verificar que a velocidade da interface aumenta com o aumento da taxa de aquecimento da placa e diminui com o aumento da pressão da câmara.

A taxa de sublimação é uma variável que depende da porosidade, da densidade da amostra e é função da velocidade da interface, como pode ser observado na equação 4. Logo, seus valores em diversas pressões de câmara e taxas de aquecimento de placa variam ao longo do tempo conforme mostra a Figura 38.

Figura 37. Velocidades da camada seca ao longo do tempo de liofilização.

Figura 38. Fluxos de vapor de água ao longo do tempo de liofilização.

A análise das figuras 35, 37 e 38 mostra que os dados obtidos com taxa de aquecimento igual a 1,5°C/min são significativamente diferentes aos obtidos com as outras duas taxas utilizadas.

Na Tabela 08 estão apresentados os valores dos parâmetros que foram utilizados na resolução do modelo.

Tabela 08. Parâmetros utilizados na modelagem matemática e seus valores.

Parâmetros	Valores
c_{pv}	1,883 kJ/ kg K
c_{pl}	0,02186 kJ/ kg K
c_{pII}	0,01025 kJ/ kg K
ρ_I	$0,38 \cdot 10^3$ kg/ m ³
ρ_{II}	$1,30 \cdot 10^3$ kg/ m ³
$\alpha_I (=k_I/ (\rho_I c_{pl}))$	0,000065 m ² / s
$\alpha_{II} (=k_{II}/ (\rho_{II} c_{pII}))$	0,00010 m ² / s
n	0,16
k_I	0,00054 kJ/ m s K
k_{II}	0,00131 kJ/ m s K
ΔH_S	2803,280 kJ/ kg

A Tabela 09 mostra os tempos de liofilização obtidos experimentalmente e matematicamente, em condições de liofilização de 160, 320 e 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Tabela 09. Tempos de liofilização obtidos experimentalmente e matematicamente, sob diferentes pressões de câmara.

Pressão (mTorr)	Tempo de liofilização (s)	
	Experimental	Simulado
160	7.620	7.718
320	7.980	8.669
480	11.040	11.806

Os tempos de liofilização observados experimentalmente apresentaram-se muito próximos dos simulados, demonstrando que os dados obtidos por meio dos modelos representam bem os ciclos de liofilização estudados.

As Figuras 39 a 41 mostram os perfis de temperatura do produto, simulados matematicamente, ou seja, a variação de temperatura do produto em diversas posições de interface (x), sob condições de pressão de 160mTorr, 320mTorr e 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min, respectivamente.

Figura 39. Temperaturas do produto, obtidas matematicamente, em diversas posições da interface, sob pressão de 160mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Figura 40. Temperaturas do produto, obtidas matematicamente, em diversas posições da interface, sob pressão de 320mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Figura 41. Temperaturas do produto, obtidas matematicamente, em diversas posições da interface, sob pressão de 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

O modelo matemático permitiu determinar os perfis de temperaturas do produto ao longo do tempo em diversas posições da interface. Tal medida seria praticamente impossível de ser determinada experimentalmente por meio de um termopar, pois a posição da interface de sublimação é dinâmica em direção ao centro da amostra.

A Figura 42 mostra os dados de temperatura do produto e temperaturas de pontos de orvalho, obtidos experimentalmente, sob pressões de 160, 320 e 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Figura 42. Temperaturas do produto e temperaturas do ponto de orvalho (PO) ao longo do tempo de liofilização, obtidos experimentalmente.

A medição da temperatura do produto durante uma liofilização se faz através de termopares inseridos no material. Quando se liofiliza produtos em frascos ou prateleiras, colocam-se esses termopares no fundo dos recipientes para que se determine a temperatura do produto na secagem primária quando todo gelo foi sublimado. No caso do pericárdio bovino, os termopares devem ser posicionados no centro geométrico da amostra, já que a liofilização ocorre no sentido das bordas para o centro. Como o pericárdio bovino é um produto

sólido e possui uma espessura muito fina, a inserção de termopares no centro geométrico da amostra é imprecisa.

A Tabela 10 apresenta os valores de coeficientes de correlação entre as curvas experimentais e as curvas obtidas matematicamente em diversas posições da interface, sob pressões de 160, 320 e 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Tabela 10. Coeficientes de correlação entre as curvas experimentais e as obtidas matematicamente, de acordo com a posição da interface.

x	Coeficientes de correlação		
	160mTorr	320mTorr	480mTorr
0,2 L	0,9422	0,9152	0,9210
0,4 L	0,9771	0,9643	0,9520
0,6 L	0,9570	0,9521	0,9631
0,8 L	0,9102	0,8944	0,9114
1,0 L	0,7752	0,7523	0,7166

Os perfis de temperatura do produto que melhor se correlacionaram aos dados experimentais obtidos sob pressões de 160mTorr, 320mTorr e 480mTorr foram, respectivamente, os obtidos em posições da interface em torno de 0,4 L, 0,4 L e 0,6 L. Sendo assim, o modelo permitiu a determinação da posição do termopar na amostra durante a liofilização.

As Figuras 43 a 45 mostram a comparação dos perfis de temperatura do produto simulados matematicamente e obtidos experimentalmente, sob as três diferentes condições de liofilização. Os gráficos obtidos apresentaram uma boa correlação entre os dados experimentais e os dados simulados.

Figura 43. Comparação entre os perfis de temperatura do produto obtidos experimentalmente e simulados de uma liofilização sob pressão de câmara de 160mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Figura 44. Comparação entre os perfis de temperatura do produto obtidos experimentalmente e simulados de uma liofilização sob pressão de câmara de 320mTorr e taxa de aquecimento de placa de 1,5°C/min.

Figura 45. Comparação entre os perfis de temperatura do produto obtidos experimentalmente e simulados de uma liofilização sob pressão de câmara de 480mTorr e taxa de aquecimento de placa de $1,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

A Figura 46 mostra os perfis de temperatura do produto obtidos matematicamente para as três diferentes condições de liofilização. Pode-se analisar o efeito da variável de processo, pressão da câmara, no perfil de temperatura do produto durante a liofilização. Verifica-se que quanto menor a pressão na câmara, mais rápido será o processo de liofilização.

Figura 46. Temperaturas do produto ao longo do tempo de liofilização, simuladas matematicamente.

Verificou-se que o modelo mostrou-se aplicável ao processo de liofilização do pericárdio bovino. Pode-se dizer que a técnica de microscopia óptica aplicada à liofilização mostrou-se eficiente na determinação da taxa de sublimação no material.

O modelo matemático utilizado foi adequado ao processo de liofilização do pericárdio bovino, permitiu monitorar o comportamento da amostra durante a liofilização, sob diversas condições. Permitiu também a análise dos parâmetros de processo sobre as variáveis dependentes do processo, como a temperatura do produto, taxa de sublimação e tempo de secagem. A validação do processo de liofilização do pericárdio bovino foi verificada pela manutenção das características do produto após a liofilização.

5. CONCLUSÕES

1. O modelo matemático utilizado para simular a liofilização do pericárdio bovino representou adequadamente os dados obtidos experimentalmente;
2. O modelo permitiu a determinação do perfil de temperatura do produto durante a secagem primária;
3. A técnica de microscopia óptica acoplada à liofilização para determinação da taxa de sublimação durante a liofilização do pericárdio bovino foi validada, assim como o processo de liofilização do pericárdio bovino, por meio da modelagem matemática;
3. A liofilização do pericárdio bovino, utilizando-se congelamento lento com *annealing*, apresentou um curto tempo de liofilização, o menor teor de umidade residual e a preservação da estrutura do produto seco quando comparada aos outros protocolos estudados, otimizando as condições de liofilização do pericárdio bovino;
4. O pericárdio bovino apresenta suporte físico suficiente para ser liofilizado a uma temperatura acima de sua temperatura de transição vítrea sem apresentar alterações em sua estrutura;
5. O pericárdio bovino não apresentou alteração significativa nas suas propriedades físicas e morfológicas após o processo de liofilização.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Freeze-drying of nanocapsules: impact of annealing on the drying process. *International Journal of Pharmaceutics*, v.324, n.1, p.74-82, 2006.

AIMOLI, C.G.; NOGUEIRA, G.M.; NASCIMENTO, L.S.; BACETI, A.; LEIRNER, A.A.; MAIZATO, M.J.S.; HIGA, O.Z.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R.N.M.; BEPPU, M.M. Lyophilized bovine pericardium treated with a phenethylamine-diepoide as an alternative to preventing calcification of cardiovascular bioprosthesis: preliminary calcification results. *Artificial Organs*, v.31, n.4, p.278–283, 2007.

ARCIDIACONO, G.; CORVI, A.; SEVERI, T. Functional analysis of bioprosthetic heart valves. *Journal of Biomechanics*, v.38, n.7, p.1483-1490, 2005.

AYROSA, A.M.I.B.; PITOMBO, R.N.M. Avaliação objetiva de cor da carne bovina crua e cozida liofilizada. *Farmácia & Química*, v.33, p.38-44, 2000.

AYROSA, A.M.I.B.; MAIZATO, M.J.S.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; HIGA, O.Z.; PITOMBO, R.N.M. Estudo do comportamento higroscópico do pericárdio bovino liofilizado. *Matéria*, v.12, n.2, p.313–321, 2007.

BOSS, E.A.; MACIEL-FILHO, R.; TOLEDO, E.C.V. Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical Engineering and Processing*, v.43, p.1475-1485, 2004.

BODMEIER, R.; PAERATAKUL, O. Dry and wet strength of polymeric films prepared from an aqueous colloidal polymer dispersion. *International Journal of Pharmaceutics*, v.96, n.1/3, p.129-138, 1993.

BUSSEMER, T.; PEPPAS, N.A.; BODMEIER, R. Time-dependent mechanical properties of polymeric coatings used in rupturable pulsatile release dosage forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.29, n.6, p.623-630, 2003.

BORGOGNONI, C.F.; TATTINI Jr., V.; AYROSA, A.M.I.B.; POLAKIEWICZ, B.; LEIRNER, A.A.; MAIZATO, M.J.S.; HIGA, O.Z.; BEPPU, M.M.; PITOMBO, R.N.M. The Influence of freezing rates on bovine pericardium tissue freeze-drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, 2009. [No prelo].

BRAILE, D.M. *Prótese valvular de pericárdio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica na posição mitral*. São Paulo, 1990. 129p. Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina.

CARPENTIER, A.; LEMAIGRE, G.; ROBERT, L.; CARPENTIER, S.; DUBOST, C. Biological factors affecting long-term results of valvular hetero-grafts. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v.58, p.467–83, 1969.

CHAKRABORTY, R.; SAHA, A.K.; BHATTACHARYA, P. Modeling and simulation of parametric sensitivity in primary freeze-drying of foodstuffs. *Separation and Purification Technology*, v.49, n.3, p.258-263, 2006.

CLYDESDALE, F.M. Color measurement. In: GRUENWEDEL, D.W.; WHITAKER, J.R., eds. *Food analysis: principles and techniques*. New York: Marcel Dekker, 1984. v.1, p.95-149.

COSGROVE, D.M.; LYTLE, B.W.; GILL, C.C.; GOLDING, L.A.; STEWART, R.W.; LOOP F.D.; WILLIAMS, G.W. *In vivo* hemodynamic comparison of porcine and pericardial valves. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v.89, p.358–368, 1985.

CURTIL, A.; PEGG, D.E.; WILSON, A. Freeze drying of cardiac valves in preparation for cellular repopulation. *Cryobiology*, v.34, n.1, p.13–22, 1997.

EVANS III, R.B.; WATSON, G.M.; MASON, E.A. Gaseous diffusion in porous media. II. Effect of pressure gradients. *Journal of Chemical Physics*, v.36, n.7, p.1894-1902, 1962.

FERGUSON, W.J.; LEWIS, R.W.; TÖMÖSY, L. A finite element analysis of freeze-drying of a coffee sample. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, v.108, n.3/4, p.341-352, 1993.

FITZPATRICK, S.; SAKLATVALA, R. Understanding the physical stability of freeze dried dosage forms from the glass transition temperature of the amorphous components. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.92, p.2504-2510, 2003.

FORD, A.W.; DAWSON, P.J. Effect of type of container, storage temperature and humidity on the biological activity of freeze-dried alkaline phosphatase. *Biologicals*, v.22, p.191-197, 1994.

GEORGE, J.P.; DATTA, A.K. Development and validation of heat and mass transfer models for freeze-drying of vegetable slices. *Journal of Food Engineering*, v.52, p.89-93, 2002.

GULLET, E.A.; FRANCIS, F.J.; CLYDESDALE, F.M. Colorimetry of foods: orange juice. *Journal of Food Science*, v.37, p.389-393, 1972.

HAFEEZ, Y.M.; ZUKI, A.B.Z.; YUSOF, N.; ASNAH, H.; LOGMAN, M.Y.; NOORDIN, M.M.; AINUL-YUZAIRI, M.Y. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium. *Cell and Tissue Banking*, v.6, p.85–89, 2005.

HOTTOT, A.; PECZALSKI, R.; VESSOT, S.; ANDRIEU, J. Freeze-drying of pharmaceutical proteins in vials: modeling of freezing and sublimation steps. *Drying Technology*, v.24, p.561–570, 2006.

HOTTOT, A.; VESSOT, S.; ANDRIEU, J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chemical Engineering and Processing*, v.46, p.666–674, 2007.

HOTTOT, A.; ANDRIEU, J.; VESSOT, S.; SHALAEV, E.; GATLIN, L.A.; RICKETTS, S. Experimental study and modeling of freeze-drying in syringe configuration. Part I: Freezing step. *Drying Technology*, v.27, p.40–48, 2009.

IONESCU, M.I.; TANDON, A.P.; MARY, D.A.S.; ABID, A. Heart valve replacement with the Ionescu-Shiley pericardial xenograft. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v.73, p.31-42, 1977.

JAMES, N.L.; POOLE-WARREN, L.A.; SCHINDHLEM, B.K.; MITCHELL, R.M.; MITCHELL, R.E.; HOWLETT, C.R. Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair. *Biomaterials*, v.12, n.9, p.801–809, 1991.

KING, C.J. *Freeze-drying of foods*. London: Butterworths, 1971. p.18-54. (Monoscience series/Chemical Rubber Company).

LANGDON, S.E.; CHERNECKY, R.; PEREIRA, C.A.; ABDULLA, D.; LEE, J.M. Biaxial mechanical/structural effects of equibiaxial strain during crosslinking of bovine pericardial xenograft materials. *Biomaterials*, v.20, n.2, p.137-153, 1999.

LEE, W.K.; PARK, K.D.; HAN, D.K.; SUN, H.; PARK, J.C.; KIM, Y.H. Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis. *Biomaterials* v.21, n.22, p.2323–2330, 2000.

LEINER, A.A.; TATTINI Jr., V.; PITOMBO, R.N.M. Prospects in lyophilization of bovine pericardium. *Artificial Organs*, v.33, n.3, p.221–229, 2009.

LIAPIS, A.I.; LITCHFIELD, R.J. Optimal control of the freeze dryer. I: Theoretical development and quasisteady-state analysis. *Chemical Engineering Science*, v.34, p.975-981, 1979a.

LIAPIS, A.I.; LITCHFIELD, R.J. Numerical solution of moving boundary transport problems in finite media by orthogonal collocation. *Computers & Chemical Engineering*, v.3, p.615-621, 1979b.

LIAPIS, A.I.; BRUTTINI, R. A theory for the primary and secondary drying stages of the freeze-drying of pharmaceutical crystalline and amorphous solutes: comparison between experimental data and theory. *Separations Technology*, v.4, n.3, p.144-155, 1994.

LIAPIS, A.I.; BRUTTINI, R. Freeze-drying. In: MUJUMDAR, A.S., ed. *Handbook industrial drying*. 2.ed. New York: Dekker, 1995. p.309-343.

LIAPIS, A.I.; PIKAL, M.J.; BRUTTINI, R. Research and development needs and opportunities in freeze drying. *Drying Technology*, v.14, n.6, p.1265-1300, 1996.

LIMA, G. *Relações entre migração e redistribuição de umidade, sobre a estabilidade do peixe pintado (Pseudoplatystoma corruscans) liofilizado*. São Paulo, 2004. 118p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LITCHFIELD, R.J.; LIAPIS, A.I. An adsorption-sublimation model for a freeze dryer. *Chemical Engineering Science*, v.34, p.1085-1090, 1979.

LOMBRANA, J.I.; IZKARA, J. Experimental estimation of effective transport coefficients in freeze drying for simulation and optimization purposes. *Drying Technology*, v.14, n.3/4, p.743-763, 1996.

MAIZATO, M.J.S. *Avaliação das propriedades do pericárdio bovino liofilizado*. Campinas, 2003. 145p. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia Mecânica - Universidade de Campinas.

MAIZATO, M.J.S.; HIGA, O.Z.; MATHOR, M.B.; CAMILLO, M.A.P.; SPENCER, P.J.; PITOMBO, R.N.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; LEIRNER, A.A. Glutaraldehydetreated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes. *Artificial Organs*, v.27, p.692–694, 2003.

MASCARENHAS, A.W.J.; AKAYAVBY, H.U.; PIKAL, M.J. A computational model for finite element analysis of the freeze-drying process. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, v.148, p.105-124, 1997.

MASON, E.A.; MALINAUSKAS, A.P.; EVANS III, R.B. Flow and diffusion of gases in porous media. *Journal of Chemical Physics*, v.46, p.3199-3216, 1967.

MASSEY, W.M.; SUNDERLAND, J.E. Heat and mass transfer in semi-porous channels with application to freeze-drying. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, v.15, p.493-502, 1972.

MILLMAN, M.J.; LIAPIS, A.I.; MARCHELLO, J.M. An analysis of the lyophilization process using a sorption-sublimation model and various operational policies. *AIChE Journal*, v.31, n.10, p.1594-1604, 1985.

MLADENOV, D.A.; TSVETKOV, T.S.D.; VULCHANOV, N.L. Freeze drying of biomaterials for the medical practice. *Cryobiology*, v.30, p.335-348, 1993.

MUJUMDAR, A.S.; LI, Y.K.; JOG, V. A simulation model for freeze-drying. In: MUJUMDAR, A.S., ed. *Drying'80*. Washington: Hemisphere; London: McGraw-Hill, 1980. p.233-241. [v.1. Developments in drying].

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*, v.25, n.6, p.1077-1086, 2004.

OETJEN, G.W.; HASELEY, P. *Freeze-drying*. 2.ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. 395p.

OVERCASHIER, D.E.; PATAPOFF, T.W.; HSU, C.C. Lyophilization of protein formulations in vials: investigation of the relationship between resistance to vapour flow during primary drying and small-scale product collapse. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.88, n.7, p.688-695, 1999.

OZAKI, K.; HAYASHI, M. Effect of cycloinulohexaose with additives on the freeze-drying of liposome. *International Journal of Pharmaceutics*, v.160, p.219–227, 1998.

PATAPOFF, T.W.; OVERCASHIER, D.E. The importance of freezing on lyophilization cycle development. *BioPharm*, v.15, n.3, p.16–21, 2002.

PIKAL, M.J.; ROY, M.L.; SHAH, S. Mass and heat transfer in vial freeze-drying of pharmaceuticals: role of the vial. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.73, p.1224-1237, 1984.

PIKAL, M.J. Use of laboratory data in freeze-drying process design: heat and mass transfer coefficients and the computer simulation of freeze drying. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v.39, n.3, p.115-139, 1985.

PIKAL, M.J.; SHAH, S.; ROY, M.L.; PUTMAN, R. The secondary drying stage of freeze drying: drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutics*, v.60, p.203-217, 1990.

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

PITOMBO, R.N.M.; SPRING, C.; PASSOS, R.F.; TONATO, M.; VITOLO, M. Effect of moisture content on the invertase activity of freeze-dried *S. cerevesae*, *Cryobiology*, v.31, p.383-392, 1994.

PITOMBO, R.N.M. Suco de laranja liofilizado: influência da atividade de água e temperatura sobre o teor de vitamina C. *Farmácia & Química*, v.32, n.4, p.45-47, 1999.

PITOMBO, R.N.M. Liofilização de proteínas para fins biotecnológicos. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA: ACTUALIDAD Y PERSPECTIVAS, 2, Arequipa, 2001. *Actas y Resúmenes*. Arequipa: Universidad Católica Santa Maria, 2001. p.53-64.

PITOMBO, R.N.M.; LIMA, G.A.M.R. Nuclear magnetic resonance and water activity in measuring the water mobility in Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) fish. *Journal of Food Engineering*, v.58, p.59-66, 2003.

RADEBAUGH, G.W.; MURTHA, J.L.; JULIAN, T.N.; BONDI, J.N. Methods for evaluating the puncture and shear properties of pharmaceutical polymeric films. *International Journal of Pharmaceutics*, v.45, p.39-46, 1988.

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

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, v.49, p.311-319, 2001.

RENÉ, F.; WOLF, E.; RODOLPHE, F. Vacuum freeze-drying of a liquid in a vial: determination of heat and mass transfer coefficients and optimisation of operating pressure. *Chemical Engineering and Processing*, v.32, p.245-251, 1993.

RINDLER, V.; HESCHEL, I.; RAU, G. Freeze-drying of red blood cells: how useful are freeze/thaw experiments for optimization of the cooling rate? *Cryobiology*, v.39, p.228–235, 1999.

SADIKOGLU, H.; LIAPIS, A.I. Mathematical modeling of the primary and secondary drying stages of bulk solution freeze drying in trays: parameter estimation and model discrimination by comparison of theoretical results with experimental data. *Drying Technology*, v.15, p.791-810, 1997.

SAGARA, Y.; ICHIBA, J. Measurement of transport properties for the dried layer of coffee solution undergoing freeze drying. *Drying Technology*, v.12, n.5, p.1081-1103, 1994.

SCHIESSER, W.E. *The numerical method of lines: integration of partial differential equations*. San Diego: Academic Press, 1991. 326p.

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

SHALAEV, E.Y.; ZOGRAFI, G. How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85, n.11, p.1137-1141, 1996.

SHEEHAN, P.; LIAPIS, A.I. Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze drying of pharmaceutical products in vials: numerical results obtained from the solution of a dynamic and spatially multi-dimensional lyophilization model for different operational policies. *Biotechnology and Bioengineering*, v.60, n.6, p.712-728, 1998.

SHENG, T.Y.R.; PECK, R.E. Rates for freeze-drying, water removal process. *AIChE Symposium Series*, v.73, n.163, p.124-130, 1977.

SHARMA, N.K.; ARORA, C.P. Prediction of transient temperature distribution during freeze-drying of yoghurt. *Drying Technology*, v.11, n.7, p.1863-1883, 1993.

SUN, W.; SACKS, M.S.; SELLARO, T.L.; SLAUGHTER, W.S.; SCOTT, M.J. Biaxial mechanical response of bioprosthetic heart valve biomaterials to high in-plane shear. *Journal of Biomechanical Engineering*, v.125, n.3, p.372-380, 2003.

SUNG, H.W.; CHANG, Y.; CHIU, C.T.; CHEN, C.N.; LIANG, H.C. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.47, n.2, p.116-126, 1999.

TAMBUNAN, A. H. F.; YUDISTIRA, W. Transport properties and heating performance in freeze drying process. In: ASIAN AUSTRALIAN DRYING CONFERENCE (ADC'99), 1, Bali, 1999. *Proceedings*. Bali, 1999. p.525-534.

TANG, X.C.; PIKAL, M.J. Design of freeze-drying process for pharmaceuticals practical advice. *Pharmaceutical Research*, v.21, n.2, p.191-200, 2004.

TATTINI Jr., V. *Etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino*. São Paulo, 2008. 106p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

TROWBRIDGE, E.A.; CROFTS, C.E. Pericardial heterograft valves: an assessment of leaflet stresses and their implications for heart valve design. *Journal of Biomedical Engineering*, v.9, 1987.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v.203, n.1/2, p.1-60, 2000.

VAN NOORT, R.; YATES, S.P.; MARTIN, T.R.; BARKER, A.T.; BLACK, M.M. A study of the effects of glutaraldehyde and formaldehyde on the mechanical behaviour of bovine pericardium. *Biomaterials*, v.3, n.1, p.21-26, 1982.

VELARDI, S.A.; BARRESI, A.A. Development of simplified models for the freeze-drying process and investigation of the optimal operating conditions. *Chemical Engineering Research and Design*, v.86, p.9-12, 2008.

YOSHIOKA, S.A.; GOISSIS, G.; ARAUJO, R.B.; RAMIREZ, V.D.A.; GODOY, M.F.; BRAILE, D.M. Performance hidrodinâmica de biopróteses valvulares cardíacas de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v.15, n.1/2, p.5-10, 1999.

ZHAI, S.; TAYLOR, R.; SANCHES, R.; SLATER, N.K.H. Measurement of lyophilisation primary drying rates by freeze-drying microscopy. *Chemical Engineering Science*, v.58, p.2313-2323, 2003.

ZIOUPOS, P.; BARBENEL, J.C. Mechanics of native bovine pericardium. I. The multiangular behaviour of strength and stiffness of the tissue. *Biomaterials*, v.15, p.366–373, 1994.

APÊNDICE I

Dados experimentais obtidos nos ensaios de colorimetria:

Tabela 11. Valores de L*, a* e b* do pericárdio bovino fresco, sem tratamento.

Amostra	L*	a*	b*	Amostra	L*	a*	b*
01	84,08	-1,58	14,41	26	84,34	-1,69	15,18
02	84,90	-1,45	10,94	27	82,43	-1,65	14,83
03	87,38	-1,87	9,44	28	85,74	-1,71	9,77
04	87,39	-2,13	7,40	29	84,79	-1,70	15,26
05	85,06	-1,13	12,41	30	85,42	-1,71	15,37
06	82,75	-0,82	17,55	31	84,73	-1,69	12,71
07	85,04	-1,76	14,59	32	84,51	-1,69	15,21
08	85,41	-2,04	9,91	33	85,23	-1,70	15,34
09	84,74	-1,48	15,07	34	87,72	-1,75	7,01
10	84,52	-1,82	14,60	35	84,55	-1,70	15,21
11	82,66	-1,65	14,88	36	84,91	-1,71	15,28
12	85,73	-1,71	13,72	37	82,32	-1,64	14,82
13	84,71	-1,69	15,24	38	85,34	-1,71	15,36
14	87,31	-1,74	15,71	39	85,51	-1,69	15,39
15	85,11	-1,70	15,32	40	84,53	-1,75	9,29
16	84,02	-1,68	15,12	41	87,42	-1,71	15,73
17	84,06	-1,68	15,13	42	85,42	-1,69	15,37
18	87,44	-1,75	9,79	43	84,35	-1,74	15,18
19	85,92	-1,72	15,46	44	84,71	-1,69	15,05
20	87,03	-1,74	15,66	45	82,90	-1,65	18,02
21	84,12	-1,68	15,14	46	85,73	-1,71	15,57
22	85,53	-1,71	10,26	47	87,62	-1,75	15,05
23	84,92	-1,70	15,28	48	85,90	-1,72	14,52
24	87,52	-1,75	15,75	49	84,32	-1,68	15,34
25	87,92	-1,76	15,82	50	84,67	-1,69	9,36

Tabela 12. Valores de L*, a* e b* do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído.

Amostra	L*	a*	b*	Amostra	L*	a*	b*
01	72,75	5,94	47,35	26	70,56	1,41	44,45
02	73,99	3,53	47,06	27	74,23	1,48	46,76
03	77,22	1,67	47,28	28	74,03	1,48	48,12
04	77,80	1,53	43,08	29	73,02	3,65	46,00
05	70,91	7,50	45,85	30	73,51	2,94	46,31
06	74,74	4,03	49,63	31	77,51	3,10	47,88
07	74,94	4,21	47,24	32	73,42	2,93	46,99
08	74,03	4,92	47,33	33	74,29	5,94	41,60
09	73,01	5,75	48,30	34	70,56	3,53	44,45
10	72,08	6,70	46,96	35	74,12	1,48	46,70
11	78,47	0,72	43,97	36	73,71	3,68	46,43
12	75,80	3,27	47,68	37	74,67	5,33	48,54
13	72,31	1,44	45,55	38	74,18	2,97	46,73
14	77,18	3,08	48,62	39	73,23	2,94	46,13
15	73,44	2,94	46,27	40	77,18	3,09	43,43
16	74,81	5,98	47,87	41	74,04	5,92	46,65
17	72,44	3,62	45,64	42	70,89	3,54	43,24
18	70,23	3,51	43,23	43	73,91	2,95	46,56
19	73,98	2,95	48,83	44	77,35	3,09	48,73
20	77,04	4,62	48,53	45	72,66	1,45	40,69
21	74,52	2,98	46,95	46	74,34	4,17	46,84
22	72,56	0,73	46,44	47	78,23	1,98	47,21
23	74,21	5,94	46,75	48	72,01	4,08	45,37
24	73,12	2,92	46,07	49	73,01	2,66	46,00
25	78,32	5,08	43,86	50	72,44	2,56	45,64

Tabela 13. Valores de L*, a* e b* do pericárdio bovino fresco, sem tratamento, liofilizado e reidratado.

Amostra	L*	a*	b*	Amostra	L*	a*	b*
01	85,91	-2,03	15,26	26	85,49	-1,70	15,39
02	85,84	-2,21	11,46	27	82,71	-1,65	14,89
03	81,37	-1,45	19,98	28	84,72	-1,69	11,01
04	84,32	-1,69	14,85	29	86,53	-1,73	15,57
05	85,28	-2,29	11,78	30	84,21	-1,68	15,16
06	84,81	-2,08	11,60	31	87,22	-2,18	15,70
07	85,74	-2,04	14,52	32	85,14	-1,70	9,36
08	83,22	-1,18	18,64	33	82,59	-1,65	14,87
09	84,52	-1,48	14,51	34	86,83	-1,74	19,02
10	83,25	-2,29	14,88	35	86,39	-1,72	15,55
11	84,02	-1,68	15,12	36	84,40	-1,69	14,35
12	85,22	-1,70	11,33	37	85,52	-1,71	15,39
13	86,82	-1,74	15,63	38	85,06	-2,06	13,61
14	86,27	-2,15	14,66	39	85,21	-2,05	15,33
15	82,82	-1,65	14,91	40	82,93	-2,13	14,93
16	84,59	-1,69	18,03	41	85,53	-1,71	16,25
17	84,28	-1,68	10,96	42	86,62	-1,73	15,59
18	86,67	-1,73	15,60	43	86,77	-1,73	15,61
19	86,52	-1,73	15,57	44	84,71	-1,67	15,05
20	83,91	-1,67	12,59	45	82,90	-1,71	18,02
21	86,29	-1,72	15,53	46	85,73	-1,73	11,44
22	83,93	-1,68	15,10	47	87,62	-1,67	15,04
23	84,65	-1,69	19,24	48	85,90	-2,23	14,52
24	86,81	-2,04	12,15	49	84,32	-2,12	15,33
25	84,01	-1,68	15,12	50	84,67	-1,67	9,36

Tabela 14. Valores de L*, a* e b* do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído, liofilizado e reidratado.

Amostra	L*	a*	b*	Amostra	L*	a*	b*
01	76,56	2,13	44,81	26	71,73	2,61	46,62
02	75,94	3,92	45,92	27	74,23	2,68	48,25
03	76,92	2,32	45,22	28	70,92	2,68	43,97
04	75,78	3,24	46,97	29	70,88	4,85	46,07
05	75,39	3,92	48,00	30	71,13	4,14	46,23
06	79,15	1,30	43,71	31	72,13	4,30	44,32
07	75,11	4,09	46,60	32	73,93	4,13	45,09
08	77,46	1,10	44,79	33	71,72	4,67	46,62
09	75,47	2,97	47,55	34	71,14	4,72	41,26
10	73,53	5,34	47,88	35	73,45	2,68	47,74
11	78,14	1,06	42,98	36	72,63	4,88	42,85
12	75,90	3,27	46,02	37	75,12	4,33	48,82
13	71,11	2,64	44,08	38	70,92	4,17	43,97
14	71,42	4,28	46,42	39	74,56	4,13	48,46
15	71,94	4,14	46,76	40	70,90	4,29	46,08
16	71,02	3,45	42,61	41	72,22	7,12	44,05
17	74,82	4,82	41,15	42	73,62	4,74	47,85
18	73,25	4,71	47,61	43	71,70	4,16	42,34
19	71,63	4,15	46,56	44	73,46	4,29	47,74
20	71,51	5,07	43,62	45	74,36	2,65	48,33
21	74,12	4,18	47,34	46	72,22	4,17	42,61
22	72,62	1,92	46,48	47	74,12	1,98	48,17
23	71,47	4,06	42,17	48	71,79	4,08	46,66
24	73,62	4,12	47,85	49	73,00	2,66	45,99
25	74,90	6,04	45,69	50	70,92	2,56	41,84

APÊNDICE II

Dados experimentais obtidos nos ensaios de tração:

Tabela 15. Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento.

Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2	Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2
1	9,39	1,23	0,56	31,45	1,00	26	5,49	1,13	0,97	35,53	0,99
2	8,52	2,22	0,64	38,24	0,99	27	6,30	1,58	0,84	51,16	1,00
3	5,16	0,85	1,05	37,32	0,99	28	9,50	2,55	0,56	48,68	1,00
4	15,35	2,01	0,74	40,01	0,99	29	9,28	2,06	0,58	30,94	0,99
5	8,08	2,24	0,65	44,64	0,99	30	4,44	1,07	1,20	37,83	0,99
6	8,37	1,18	0,67	36,45	0,99	31	9,65	1,51	0,56	41,31	0,99
7	6,82	1,39	0,77	35,43	1,00	32	9,78	2,43	0,57	46,56	1,00
8	7,57	1,69	0,71	44,41	0,99	33	12,51	1,96	0,44	34,04	0,99
9	6,27	1,37	0,87	38,45	0,99	34	9,20	2,37	0,58	44,77	0,99
10	9,38	1,55	0,57	40,16	0,99	35	5,86	1,05	0,91	49,35	0,99
11	9,71	2,28	0,55	44,34	0,99	36	7,97	1,81	0,68	50,16	0,99
12	5,38	1,30	1,02	30,45	0,99	37	7,50	2,20	0,71	31,56	0,99
13	8,23	1,13	0,65	50,00	0,99	38	2,06	2,10	0,83	36,22	1,00
14	7,36	1,91	0,74	34,52	1,00	39	6,70	1,04	0,81	49,68	1,00
15	16,69	3,24	0,48	51,00	0,99	40	5,73	1,36	0,95	44,52	0,99
16	2,54	1,43	0,91	44,69	1,00	41	5,82	1,80	0,91	31,25	1,00
17	9,45	2,01	0,58	36,90	1,00	42	5,29	0,93	1,02	37,46	0,99
18	8,20	2,21	0,64	47,62	0,99	43	12,34	2,15	0,55	41,78	0,99
19	8,11	1,28	0,67	34,57	0,99	44	5,00	0,99	1,05	50,80	0,99
20	5,34	1,17	1,02	30,65	0,99	45	9,48	1,32	0,55	51,67	0,99
21	6,72	1,94	0,81	40,17	0,99	46	2,59	1,38	0,96	31,25	0,99
22	5,20	0,94	1,05	46,96	1,00	47	9,16	2,07	0,60	35,46	0,99
23	9,83	2,88	0,54	34,87	1,00	48	4,59	1,32	1,17	44,95	0,99
24	12,63	1,33	0,65	40,62	0,99	49	8,10	1,77	0,67	41,03	0,99
25	8,03	1,82	0,67	49,35	0,99	50	7,00	1,20	0,77	33,71	0,99

Tabela 16. Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído.

Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2	Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2
1	8,80	1,09	1,18	30,79	1,00	26	12,50	2,54	0,90	33,29	0,99
2	11,98	2,52	0,91	32,59	0,99	27	10,65	3,02	0,99	39,48	0,99
3	8,92	2,42	1,23	35,94	0,99	28	8,74	2,93	1,19	44,03	0,99
4	12,19	4,14	0,89	32,91	0,99	29	4,35	1,96	1,22	34,09	0,99
5	12,34	4,55	0,88	39,17	0,99	30	9,60	2,88	1,10	35,92	0,99
6	23,85	2,92	0,45	37,14	1,00	31	21,42	7,01	0,49	42,57	0,99
7	8,54	2,26	1,24	41,78	1,00	32	11,21	2,39	0,96	40,67	0,99
8	10,67	2,62	0,99	32,57	0,98	33	10,95	2,28	0,96	31,05	0,99
9	8,98	1,69	1,18	35,71	0,99	34	11,44	1,71	0,93	36,89	0,99
10	12,40	1,52	0,88	38,99	0,99	35	6,49	1,75	0,91	34,25	0,99
11	10,74	2,95	1,01	42,72	1,00	36	22,02	6,08	0,49	33,67	0,99
12	9,88	1,99	1,10	43,75	1,00	37	14,58	3,30	0,75	35,31	0,98
13	20,39	2,65	0,53	32,35	0,99	38	14,27	3,13	0,84	37,43	1,00
14	4,17	3,03	1,02	44,21	1,00	39	12,08	3,94	0,86	46,03	1,00
15	9,11	2,51	1,15	45,39	1,00	40	12,17	3,46	0,89	44,40	0,99
16	8,72	2,55	1,21	38,17	1,00	41	11,82	2,35	0,90	44,39	1,00
17	19,78	4,04	0,54	30,13	0,99	42	11,44	3,56	0,92	31,61	1,00
18	8,77	1,48	1,21	40,58	0,99	43	12,02	1,92	0,88	39,09	0,99
19	10,37	2,05	1,02	33,22	1,00	44	5,53	2,01	0,99	40,88	1,00
20	24,67	3,41	0,43	42,68	1,00	45	22,24	5,03	0,49	39,38	0,99
21	12,29	3,39	0,88	43,49	1,00	46	21,02	3,49	0,51	31,21	0,99
22	11,34	3,00	0,93	38,50	0,99	47	10,81	3,23	1,02	37,19	0,99
23	10,95	1,56	0,95	32,57	0,99	48	11,27	1,97	0,96	35,56	1,00
24	21,29	3,27	0,51	38,13	0,99	49	11,86	2,95	0,91	34,39	0,99
25	11,38	1,56	0,96	40,82	0,99	50	23,93	4,33	0,46	30,00	0,99

Tabela 17. Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento, liofilizado e reidratado.

Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2	Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2
1	9,76	1,34	0,55	31,67	1,00	26	5,65	1,49	0,97	41,78	1,00
2	9,04	2,75	0,64	50,71	1,00	27	7,01	1,03	0,84	41,33	1,00
3	19,29	2,77	0,56	44,38	1,00	28	13,50	1,68	0,59	42,34	1,00
4	6,14	3,87	0,45	33,16	0,99	29	9,04	2,69	0,61	31,76	0,99
5	8,65	1,11	0,67	35,94	1,00	30	9,71	1,82	0,57	48,89	0,99
6	8,81	1,97	0,68	29,07	1,00	31	10,10	1,51	0,56	45,19	0,99
7	6,74	1,53	0,84	51,28	0,99	32	9,72	1,71	0,58	48,95	1,00
8	5,34	0,73	1,02	34,30	1,00	33	11,01	2,09	0,57	41,33	0,99
9	5,93	1,65	0,94	41,91	0,99	34	9,48	1,73	0,61	49,84	0,99
10	12,59	1,94	0,46	48,04	1,00	35	9,11	1,30	0,62	40,40	1,00
11	6,57	1,03	0,88	46,42	1,00	36	7,18	1,62	0,81	29,75	1,00
12	8,73	1,15	0,65	49,92	1,00	37	6,80	1,49	0,88	31,90	1,00
13	8,79	1,65	0,63	50,83	1,00	38	6,23	0,88	0,84	50,13	1,00
14	7,91	1,95	0,73	49,92	1,00	39	18,32	2,11	0,42	32,34	1,00
15	10,85	3,18	0,55	28,99	1,00	40	5,70	1,20	0,99	36,74	0,99
16	15,45	4,02	0,38	48,10	1,00	41	10,77	3,10	0,53	40,13	1,00
17	9,32	2,58	0,61	30,40	0,99	42	5,52	0,75	1,00	43,64	0,99
18	8,08	2,79	0,68	41,25	0,99	43	5,59	1,45	0,98	37,16	0,99
19	7,96	2,50	0,67	51,00	0,99	44	7,67	2,01	0,74	50,11	1,00
20	5,57	2,19	0,71	42,94	1,00	45	21,31	2,54	0,56	48,14	1,00
21	6,65	1,51	0,88	45,54	1,00	46	5,73	1,48	0,99	48,05	0,99
22	5,69	1,44	1,03	48,59	0,99	47	8,34	1,19	0,68	32,90	0,99
23	6,82	1,42	0,83	33,64	0,99	48	5,57	1,43	0,99	31,79	1,00
24	8,03	2,26	0,68	37,16	1,00	49	6,74	1,68	0,92	44,55	1,00
25	13,03	1,82	0,42	31,39	1,00	50	7,14	2,21	0,79	30,95	1,00

Tabela 18. Valores de elasticidade (E), tensão de ruptura (σ_{rup}), da área da seção transversal das amostras (A), coeficiente de correlação da região elástica da curva (R^2) e deformação (ϵ_T) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído, liofilizado e reidratado.

Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2	Amostras	E (kgf/mm ²)	σ_{rup} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_T (%)	R^2
1	14,45	1,55	0,71	33,66	1,00	26	11,52	1,21	0,90	37,50	1,00
2	14,93	1,87	0,69	48,08	1,00	27	21,52	2,71	0,48	33,55	1,00
3	13,22	2,31	0,78	37,02	0,99	28	13,75	4,89	0,77	38,44	1,00
4	14,91	3,49	0,71	40,94	1,00	29	5,43	1,88	0,64	43,46	1,00
5	15,01	4,43	0,70	44,44	1,00	30	15,40	4,06	0,66	34,85	1,00
6	15,66	1,78	0,67	37,89	0,98	31	15,35	2,98	0,67	33,01	1,00
7	13,96	3,86	0,75	44,21	1,00	32	15,82	4,74	0,63	34,69	1,00
8	17,77	1,88	0,58	38,46	0,99	33	17,11	3,21	0,61	37,50	1,00
9	17,22	2,11	0,61	38,17	1,00	34	17,02	4,38	0,62	44,44	1,00
10	16,43	2,05	0,63	44,87	1,00	35	18,35	4,53	0,63	35,95	1,00
11	15,52	2,99	0,67	32,15	1,00	36	15,11	3,10	0,68	43,97	1,00
12	13,65	3,43	0,75	33,55	1,00	37	13,48	4,09	0,75	45,75	1,00
13	3,80	0,71	1,26	43,67	1,00	38	4,49	2,36	0,84	29,61	1,00
14	10,06	1,86	1,02	35,06	1,00	39	26,16	3,63	0,38	35,10	1,00
15	26,08	8,69	0,39	32,68	0,99	40	29,27	9,63	0,35	36,45	0,99
16	8,45	2,14	1,21	39,74	1,00	41	11,94	2,79	0,89	38,75	1,00
17	10,32	3,03	1,02	36,39	1,00	42	11,09	3,35	0,92	35,71	1,00
18	8,36	0,99	1,21	51,32	1,00	43	3,54	1,02	0,88	37,82	1,00
19	10,03	1,66	1,03	41,04	1,00	44	10,77	1,51	1,00	40,24	1,00
20	8,76	1,71	1,16	33,01	1,00	45	23,62	6,64	0,45	37,50	1,00
21	11,31	1,47	0,88	42,33	1,00	46	5,42	1,18	1,17	39,06	0,99
22	4,08	3,64	0,93	40,33	0,99	47	10,25	3,62	1,02	47,77	1,00
23	10,93	2,51	0,95	42,68	1,00	48	24,72	5,39	0,42	37,66	1,00
24	9,69	1,84	1,08	43,35	1,00	49	11,56	1,75	0,91	35,38	1,00
25	10,80	2,19	0,95	45,16	1,00	50	11,53	2,71	0,92	32,92	1,00

APÊNDICE III

Dados experimentais obtidos nos ensaios de punção:

Tabela 19. Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento.

Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)	Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)
1	11,69	10,45	2,01	68,81	44,62	26	10,06	5,05	1,98	171,11	36,25
2	11,23	5,71	1,77	174,83	21,46	27	12,09	9,38	1,92	72,04	38,25
3	10,28	4,76	2,12	95,51	21,03	28	12,55	5,66	1,73	97,23	20,82
4	10,55	4,78	1,88	178,57	34,42	29	11,71	5,18	1,95	76,96	21,46
5	11,61	8,46	1,89	92,08	34,00	30	10,37	5,62	1,94	158,15	47,69
6	13,57	5,81	1,72	70,42	21,25	31	12,41	5,48	1,86	73,68	21,67
7	11,64	5,32	1,71	172,97	19,34	32	1,75	10,31	1,94	160,00	78,50
8	12,09	5,52	1,83	88,67	21,46	33	8,80	4,59	2,31	145,31	37,36
9	11,44	7,41	1,89	98,95	29,75	34	10,46	4,37	2,22	72,04	20,61
10	8,21	4,15	2,43	169,26	21,46	35	9,20	4,57	2,19	154,48	21,25
11	8,81	3,77	2,44	102,42	19,55	36	9,59	3,63	2,45	68,80	18,91
12	12,62	5,57	1,85	70,42	21,88	37	8,91	4,49	2,25	161,84	21,46
13	11,16	4,38	1,92	104,17	17,85	38	9,27	4,54	2,20	141,66	21,25
14	10,29	5,38	1,95	160,00	34,91	39	10,95	4,53	2,12	72,04	20,40
15	9,99	4,76	2,12	111,18	21,46	40	8,61	4,24	2,36	145,31	29,25
16	9,01	4,44	2,34	114,71	22,10	41	12,71	12,50	1,84	70,10	48,87
17	19,68	7,24	1,17	73,68	18,06	42	5,11	5,23	1,93	160,00	33,58
18	10,59	5,34	1,89	163,69	34,59	43	26,16	5,48	1,99	138,02	23,16
19	11,77	5,38	1,95	75,31	21,79	44	11,06	5,00	2,10	72,05	22,31
20	10,69	8,16	1,96	118,26	33,20	45	8,53	3,99	2,38	147,13	20,18
21	10,95	5,31	1,88	132,59	20,75	46	9,69	4,48	2,41	70,42	22,95
22	1,54	11,64	1,89	169,26	78,65	47	9,52	4,74	2,11	160,03	21,25
23	10,12	5,05	1,96	178,57	37,87	48	10,46	4,87	1,93	152,63	19,97
24	9,89	4,49	2,36	70,42	21,99	49	11,19	5,81	1,84	132,59	22,73
25	7,44	3,71	2,83	114,71	21,79	50	8,46	3,85	2,41	141,66	19,76

Tabela 20. Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído.

Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)	Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)
1	29,52	11,25	2,31	37,24	31,59	26	18,44	7,34	3,01	70,42	54,14
2	26,42	9,22	2,45	42,84	27,46	27	9,60	6,34	3,42	59,29	26,36
3	12,18	6,98	3,31	51,64	28,07	28	19,00	4,80	3,33	45,72	26,97
4	16,73	6,01	3,74	47,19	27,33	29	8,78	7,01	3,25	60,86	46,74
5	23,96	14,06	2,59	50,15	43,74	30	15,99	5,94	3,67	57,74	26,49
6	3,95	8,27	2,78	70,40	56,35	31	17,64	6,07	3,66	42,84	27,09
7	19,30	7,01	3,21	48,66	27,33	32	16,43	5,90	3,81	47,19	27,33
8	18,80	7,05	3,33	47,19	28,55	33	12,23	10,26	3,02	67,20	37,67
9	17,24	6,43	3,67	45,72	28,67	34	16,95	6,56	3,41	60,86	27,21
10	4,43	4,00	3,89	68,81	35,76	35	22,86	8,01	2,71	48,66	26,36
11	21,86	6,89	3,12	37,24	26,12	36	31,78	8,67	2,70	56,20	28,55
12	14,01	5,51	3,72	53,15	24,91	37	22,14	8,19	2,77	50,14	27,58
13	21,11	11,87	2,78	57,74	40,09	38	20,14	8,47	2,81	65,60	54,74
14	21,08	7,24	3,19	38,62	28,06	39	19,83	7,91	3,01	54,67	28,91
15	17,25	6,15	3,46	54,67	25,87	40	21,62	7,93	2,81	51,64	27,09
16	9,24	5,67	3,97	37,24	41,62	41	21,00	14,52	2,41	53,15	42,52
17	5,31	6,88	3,21	70,41	54,14	42	22,07	7,59	2,66	57,74	24,54
18	18,33	6,43	3,62	40,01	28,31	43	21,66	7,97	2,71	57,05	26,24
19	5,67	2,46	3,81	59,29	42,23	44	23,93	8,00	2,81	38,62	27,33
20	17,40	6,85	3,21	68,82	26,73	45	21,06	12,82	2,82	56,21	43,74
21	9,07	5,93	3,81	41,42	27,46	46	13,83	10,31	2,91	40,01	36,45
22	17,51	7,01	3,21	67,20	27,33	47	20,57	8,66	2,77	64,01	51,60
23	17,68	5,85	3,66	42,84	26,00	48	21,00	6,89	3,12	41,42	26,12
24	4,70	7,88	2,78	62,43	51,46	49	17,23	7,12	3,33	62,43	28,79
25	21,84	7,37	2,93	44,28	26,24	50	17,45	2,59	3,71	42,84	11,69

Tabela 21. Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, sem tratamento, liofilizado e reidratado.

Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)	Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)
1	12,39	4,03	2,33	93,79	19,97	26	4,27	6,01	1,93	125,39	24,65
2	6,08	5,39	2,17	132,59	24,86	27	14,68	5,58	1,88	116,47	22,31
3	10,76	4,34	2,44	160,00	22,52	28	16,09	6,45	1,72	114,71	23,58
4	14,59	10,40	1,97	95,51	43,56	29	18,53	5,76	1,77	98,95	21,67
5	11,49	4,45	2,31	147,14	44,80	30	12,92	5,49	2,13	118,26	24,86
6	14,08	5,98	1,92	130,79	24,43	31	11,72	4,46	2,33	123,60	22,10
7	12,34	5,02	2,33	95,50	24,86	32	9,48	3,87	2,81	143,48	23,16
8	13,57	10,45	1,96	145,31	43,56	33	11,33	4,69	2,45	112,94	24,43
9	12,51	5,39	2,13	143,48	24,41	34	4,37	13,92	1,76	145,31	93,10
10	19,30	5,85	2,00	93,79	24,86	35	13,82	5,55	1,98	121,82	23,37
11	14,89	5,32	1,82	128,99	20,61	36	20,29	7,45	1,53	152,63	24,22
12	13,84	9,58	1,93	141,66	39,31	37	16,98	7,01	1,64	111,17	24,44
13	13,19	5,34	2,17	97,23	24,65	38	15,42	9,83	1,78	120,06	37,18
14	10,69	4,17	2,56	121,82	22,73	39	3,79	5,70	1,98	148,97	24,01
15	3,45	4,11	2,35	139,84	30,87	40	14,04	5,02	1,99	109,41	21,25
16	15,33	6,07	1,86	98,95	24,01	41	13,02	5,37	2,12	116,48	24,22
17	5,05	5,53	1,99	138,02	23,37	42	10,84	4,71	2,44	150,80	24,43
18	13,98	5,12	1,93	132,58	21,03	43	13,94	5,12	2,01	107,66	21,88
19	6,19	6,15	1,82	127,19	23,80	44	12,62	4,97	2,09	154,47	22,10
20	15,18	6,38	1,77	136,21	24,01	45	7,49	5,11	2,11	156,31	22,95
21	14,87	10,20	1,91	100,69	41,43	46	13,26	12,50	2,12	105,91	56,31
22	13,07	9,76	2,10	120,03	43,56	47	14,39	5,45	1,96	104,17	22,73
23	12,12	5,04	2,22	134,40	23,80	48	17,30	5,41	1,94	114,71	22,31
24	12,39	4,97	2,31	97,23	24,43	49	5,73	12,18	2,01	158,15	52,06
25	13,28	5,02	2,01	141,66	21,46	50	13,00	5,39	2,13	114,74	24,43

Tabela 22. Valores de elasticidade à punção (E_{punc}), tensão de punção (σ_{punc}), da área da seção transversal das amostras (A), deformação à punção (ϵ_P) e energia de punção (ΔE_{punc}) do pericárdio bovino fresco, tratado com glutaraldeído, liofilizado e reidratado.

Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)	Amostras	E_{punc} (kgf/mm ²)	σ_{punc} (kgf/mm ²)	A (mm ²)	ϵ_P (%)	ΔE_{punc} (kgf.mm)
1	26,44	9,32	2,68	64,33	66,50	26	18,92	6,18	3,12	40,01	26,05
2	20,60	13,06	2,91	38,76	44,55	27	17,48	5,94	3,35	40,71	26,86
3	10,12	6,89	2,73	62,75	47,18	28	14,80	6,75	2,93	52,24	35,05
4	18,34	7,38	3,02	46,01	30,10	29	4,77	12,63	2,85	56,35	48,60
5	10,56	9,30	3,01	51,19	37,80	30	17,50	7,30	2,75	66,24	27,13
6	18,35	6,68	3,29	38,20	29,70	31	21,49	7,79	2,77	39,31	29,16
7	17,84	7,29	2,99	50,29	29,43	32	18,46	6,31	3,01	45,73	25,65
8	18,84	6,61	2,98	44,42	26,59	33	27,82	12,32	2,84	39,73	47,25
9	24,40	7,65	2,47	38,34	25,55	34	18,04	6,53	3,12	44,42	27,54
10	8,27	6,60	2,77	47,77	24,70	35	14,06	4,85	3,75	51,79	24,57
11	18,45	11,31	2,83	53,00	25,78	36	12,40	5,44	3,84	68,32	28,21
12	3,63	6,69	2,84	66,56	47,12	37	13,49	6,24	3,49	70,74	29,43
13	17,53	7,14	3,01	51,64	29,02	38	19,93	6,46	3,11	48,07	27,13
14	15,64	5,85	3,33	53,30	26,32	39	17,07	5,99	3,02	54,82	24,43
15	18,91	6,52	3,02	42,98	26,59	40	19,62	7,22	3,03	39,45	29,56
16	19,96	7,17	2,73	47,77	26,46	41	20,22	6,96	2,93	39,73	27,54
17	23,24	11,77	2,21	55,28	28,62	42	19,87	6,27	2,87	43,12	24,30
18	10,02	7,91	2,73	67,52	48,81	43	28,32	8,78	2,47	44,71	29,29
19	15,94	5,98	2,84	80,61	26,19	44	19,93	7,77	2,38	69,13	24,97
20	26,42	12,16	2,63	53,30	43,20	45	20,27	9,05	2,33	70,09	59,92
21	20,61	8,24	2,73	44,42	30,37	46	6,24	10,79	2,78	53,46	40,50
22	21,24	7,11	2,77	40,29	26,59	47	19,68	12,97	2,77	47,77	43,20
23	18,54	10,48	2,86	51,04	40,50	48	9,22	7,79	2,81	70,58	51,57
24	17,06	7,74	2,84	64,96	58,96	49	28,16	16,74	2,09	40,29	47,25
25	24,17	10,51	2,13	54,97	30,24	50	27,49	8,73	2,13	40,71	25,11