



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE ESTUDOS DE VENENOS E ANIMAIS  
PEÇONHENTOS**

**Juliana de Barros Mennocchi**

**Pontos críticos na liofilização dos componentes do  
Selante de Fibrina Heterólogo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu, e do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Pesquisa Clínica.

**Orientador: Profº Drº Rui Seabra Ferreira Junior**

**Botucatu - SP  
2021**

JULIANA DE BARROS MENNOCCHI

## Pontos críticos na liofilização dos componentes do Selante de Fibrina Heterólogo

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu, e do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Pesquisa Clínica.

Orientador: Profº Drº Rui Seabra Ferreira Junior.

Botucatu - SP  
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mennocchi, Juliana de Barros.

Liofilização do selante de fibrina heterólogo / Juliana de Barros Mennocchi. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Capes: 40101002

1. Liofilização. 2. Fibrina. 3. Adesivo tecidual de fibrina. 4. Proteínas. 5. Bioprodutos.

Palavras-chave: Bioprodutos; Liofilização; Proteínas; Selante de fibrina.

# *DEDICATÓRIA*

Dedico esse trabalho a minha filha, minha mãe e padrasto, que sempre me incentivaram, principalmente nos momentos que precisei.

# AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Rui Seabra Ferreira Junior.

Ao Cevap-Unesp, pela infraestrutura concedida durante o mestrado.

Ao Departamento de TÉCNOLOGIA BIOQUÍMICA FARMACÊUTICA da USP, por me oferecer estrutura, equipamentos e ajuda quando eu mais precisei.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marco Stephano, por oferecer toda ajuda e todo espaço de seu laboratório.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natália Bexiga, que me mostrou que a liofilização vai além de uma simples técnica e sim uma paixão.

A todos os professores que nesse curto tempo de mestrado, aulas e trabalho, me ajudaram de uma forma diferente enxergar essa trajetória, como algo que acrescenta não somente a mim, mas a todos, meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O Selante Heterólogo de Fibrina (SHF) foi desenvolvido com tecnologia 100% nacional em uma Universidade Pública Brasileira sendo um bioproduto derivado de um hemocomponente rico em fibrinogênio extraído do sangue de búfalos e de uma enzima isolada e purificada do veneno da cascavel Sulamericana. Diferentemente dos selantes de fibrina comercialmente disponíveis, não possui derivados de sangue humano em sua composição, adicionando enormes vantagens a seu uso. Um dos grandes desafios é aumentar o seu tempo de prateleira que é de dois anos e a sua apresentação que é congelado a - 20 °C. Desta maneira, o objetivo deste projeto foi padronizar a técnica de liofilização dos componentes do (SHF) estudando as temperaturas críticas envolvidas no processo. Para isso, diversos parâmetros foram avaliados como os pontos de Congelamento, Transição vítrea, Vitriificação, Ponto Eutético e Temperatura de Colapso. Por meio da avaliação do processo de liofilização utilizando o DSC Q20 com acessório de resfriamento RCS 90 e do FDM – Freezer Drying Microscopy, conseguimos identificar pontos de temperaturas envolvidas no processo de liofilização do crioprecipitado e da giroxina. Os resultados são complementares e, portanto, pudemos mapear o processo de liofilização completa dos componentes do SHF e recomendamos também a necessidade de utilização de tampões e estabilizantes em uma das técnicas já que encontramos duas temperaturas de transição vítrea para a giroxina. Já o crioprecipitado mostrou resultados mais adequados mesmo em sua composição natural. Espera-se com a aplicação dessa técnica, viabilizar o maior escalonamento do produto, podendo, portanto, utilizá-lo amplamente para outras aplicações.

**Palavras-chave:** Liofilização, proteínas, bioprodutos, selante de fibrina

## **ABSTRACT**

The Fibrin Heterologous Sealant (SHF) was developed with 100% national technology at a Brazilian Public University and is a bioproduct derived from a blood component rich in buffalo fibrinogen and an enzyme isolated and purified from the venom of the South American rattlesnake. Unlike commercially available fibrin sealants, it does not contain human blood derivatives in its composition, adding enormous advantages to its use.

One of the biggest challenges is to increase its shelf life which is two years and its presentation which is frozen at - 20 °C. Thus, the objective of this project was to standardize the freeze-drying technique for the components of (SHF) by studying the critical temperatures involved in the process.

For that, several parameters were evaluated, such as the Freezing points, Glass transition, Vitrification, Eutectic point and Collapse Temperature. Through the evaluation of the lyophilization process using the DSC Q20 with cooling accessory RCS 90 and the FDM - Freezer Drying Microscopy, we were able to identify points of temperatures involved in the freeze-drying process of cryoprecipitate and gyroxin. The results are complementary and, therefore, we were able to map the complete lyophilization process of the components of the SHF and we also recommend the need to use buffers and stabilizers in one of the techniques since we found two glass transition temperatures for gyroxin. Cryoprecipitate showed more adequate results even in its natural composition. It is hoped with the application of this technique, to make the product more scalable and, therefore, able to use it widely for other applications.

**Keywords:** Lyophilization, proteins, bioproducts, fibrin sealant

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Selante de Fibrina</b>	<b>9</b>
1.1.1 <i>Mecanismo de ação do selante de fibrina</i> .....	10
1.1.2 <i>Selante de Fibrina Heterólogo</i> .....	10
1.1.3 <i>Uso terapêutico do selante de fibrina</i> .....	13
<b>1.2 Liofilização</b>	<b>15</b>
1.2.1 <i>Vantagens da liofilização</i> .....	17
1.2.2 <i>Produtos liofilizados</i> .....	17
1.2.3 <i>Estágios da liofilização</i> .....	18
1.2.4 <i>O ciclo de liofilização</i> .....	19
1.2.5 <i>Princípios do Processo de liofilização</i> .....	21
1.2.6 <i>Pontos críticos analisados na liofilização</i> .....	26
1.2.7 <i>Efeito de tampões, ligantes e estabilizadores na formulação</i> .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Objetivos gerais</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Aspectos éticos</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Obtenção do Selante de Fibrina</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Equipamentos e técnicas utilizadas</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Processo e pontos críticos analisados</b>	<b>31</b>
<b>3.4.1 Crioprecipitado</b>	<b>31</b>
3.4.2 <i>Giroxina</i> .....	32
<b>3.5 Temperatura de colapso</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Freezer Drying Microscopy - FDM</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Crioprecipitado analisado pelo FDM</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Giroxina analisada pelo FDM</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Análises com DSC Q20</b>	<b>37</b>
4.4.1 <i>Crioprecipitado</i> .....	38
4.4.2 <i>Giroxina</i> .....	44
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>53</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Selante de Fibrina

Os selantes de fibrina disponíveis comercialmente são produtos biológicos obtidos por meio da união da trombina e do fibrinogênio humanos<sup>12</sup>, estes são capazes de reduzir ou deter hemorragias em situações clínicas e cirúrgicas. Dessa forma, são usados somente em casos cirúrgicos específicos devido ao alto custo e a sua ação é baseada na polimerização da fibrina, formando uma rede estável<sup>15</sup>.

Sendo assim, são produzidos a partir de bolsas individuais do plasma humano (componente líquido do sangue) congelado de poucos doadores. O produto é submetido a testes de biologia molecular para identificação de patógenos como, vírus HIV, HTLV, das hepatites B e C e o parvovírus B19. Em seguida, o plasma passa por um processo de inativação viral, que isenta o insumo de risco de contaminação ainda por outras doenças infecciosas. Na sequência, o plasma é processado dando origem a dois componentes da formulação: o crioprecipitado rico em fibrinogênio, obtido a partir do descongelamento do plasma e da retirada da sua porção insolúvel (precipitado); bem como a trombina. As substâncias são então envasadas na forma líquida em frascos-seringa duplos e estocadas a -30°C.

O produto pode ser usado imediatamente após seu descongelamento, que ocorre em cinco minutos. No momento do uso, a trombina e o crioprecipitado são aplicados de forma separada e ao se misturarem, reagem como num processo de coagulação natural, transformando-se em fibrina, formando uma espécie de “rede” no local do sangramento, dando início ao processo de coagulação. Esta não possui contraindicação ou risco de rejeição já que usa hemocomponentes homólogos. Porém possui desvantagens significativas, por utilizar sangue humano como matéria prima, que um produto caro e escasso levando a um baixo rendimento e dificuldade de escalonamento, elevando, portanto, seu custo e sendo indicado apenas para usos nobres<sup>15</sup>.

### *1.1.1 Mecanismo de ação do selante de fibrina*

Sua ação é baseada na polimerização da fibrina causada por uma reação entre fibrinogênio e trombina. Os princípios biológicos dos Selantes de Fibrina são similares aos da cascata da coagulação, formando um coágulo de fibrina. O Selante é preparado pela combinação de um concentrado de fibrinogênio e trombina, reconstituído em solução de cloreto de cálcio. A aderência ocorre pela afinidade da mistura de colágeno que imita a última fase da cascata da coagulação, por meio de fibrinogênio e ativação do fator XIII pela trombina na presença de íons cálcio. Este último é responsável por conferir a estabilidade ao coágulo formado.

O fibrinogênio convertido em fibrina, origina, portanto, um coágulo estável e reforçado pela ativação do fator XIII, que também participa da síntese de colágeno, estimulando a proliferação de fibroblastos levando a cicatrização<sup>2</sup>.

### *1.1.2 Selante de Fibrina Heterólogo*

Os riscos de transmissão de doenças infecciosas podem ocorrer já que o Selante de Fibrina Homólogo é elaborado com sangue humano. Levando estas informações em consideração, foi proposta a produção de um novo Selante de Fibrina por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Universidade Estadual Paulista – Botucatu, Brasil. Um produto, inovador, 100% brasileiro, que visa substituir os selantes feitos com sangue humano. Como objetivo principal, era a não utilização de sangue humano para a produção do Selante e sim de animais de grande porte, como búfalos, de onde foi extraído e utilizado como substituto do fibrinogênio humano. Estudos mostraram que bubalinos apresentam maior nível de fibrinogênio do que outras espécies de animais. Ao invés de trombina bovina, foi utilizada uma fração do complexo giroxina, um componente neurotóxico

isolado a partir do veneno de *Crotalus durissus*, pertencente ao grupo das enzimas trombina-*like*, importante fonte de serinoprotease, derivada do veneno de serpente por ser várias vezes mais potente que a trombina bovina<sup>5, 6</sup>. É um produto biológico e biodegradável, não produz reações adversas, não contém componentes de sangue humano, portanto não transmite doenças infecciosas veiculadas pelo sangue humano, possui ótima capacidade adesiva, pode ser produzido em grande escala, já que o fornecimento de sangue bovino é maior, e mais barato<sup>5</sup>.

O selante de fibrina produzido no Cevap/UNESP de Botucatu é produzido a partir de componentes derivados de animais, a Serinoprotease (Giroxina) isolada e purificada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (semelhante a trombina por sua atividade enzimática, capaz de induzir a formação de uma rede de fibrina e de um coágulo estável) e crioprecipitado, um precipitado frio de plasma fresco congelado, rico em fibrinogênio, fator VIII, fator de Willerbrand, fator XIII e fibronectina obtido a partir de sangue de búfalos adultos. Esses componentes são misturados a um diluente no momento do uso gerando uma rede de fibrina a exemplo dos selantes de fibrina originários do sangue humano<sup>16</sup>.

O selante de fibrina heterólogo, também age como a etapa final da cascata de coagulação, a giroxina atua sobre a molécula de fibrinogênio, transformando a em monômeros de fibrina. A polimerização na presença de cálcio forma coágulo estável com efeito adesivo, homeostático e selante<sup>16</sup>.

Desenvolvido para regeneração tecidual, este novo selante de fibrina atua como substrato para o crescimento celular e mostra uma grande biocompatibilidade, como demonstrado por pesquisas em animais e humanos<sup>2</sup>. O selante heterólogo de fibrina já foi avaliado em um estudo clínico de fase I/II como cicatrizante para úlceras venosas crônicas que provocam dores atrozes, tendo apresentado excelentes resultados de segurança e imunogenicidade<sup>2</sup>.

A gioxina apresenta atividades coagulantes e neurotóxica, por esse motivo deve ser isolada e purificada garantindo assim que não haja contaminantes de outras proteínas<sup>28</sup>.

O caminho do selante heterólogo de fibrina até as farmácias é um assunto promissor e pode ser muito útil numa formulação perfeita, rápida e prática. Para isso sua formulação precisa estar em forma farmacêutica adequada de fácil e completa solubilização, no caso de um produto liofilizado, para aumentar o tempo de prateleira e poder ter acesso por toda a população.

A liofilização é uma estratégia interessante para este tipo de produto, proporciona aumento do tempo de validade e garante que sua utilização ganhe novas indicações, pois devido ao seu custo baixo de produção comparado ao selante de sangue humano, torna-se muito mais viável.

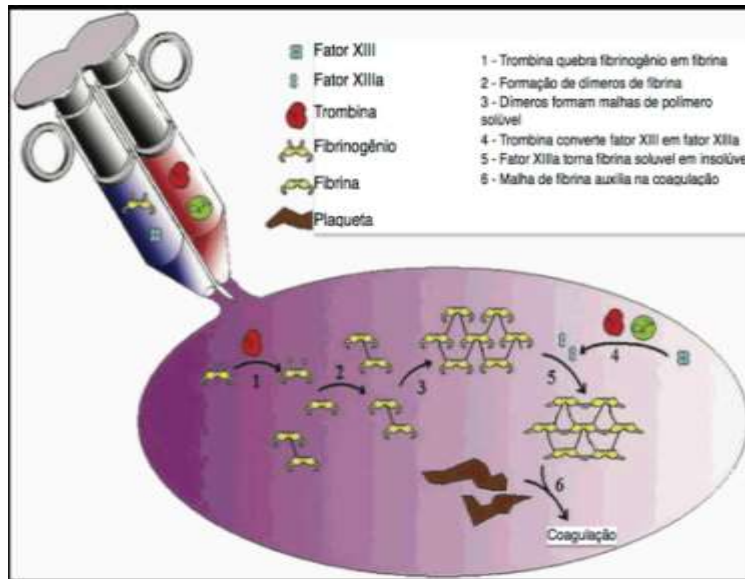
Para que os seus componentes proteicos, ou seja, o crioprecipitado e a gioxina seja útil na formulação de selante de fibrina em forma farmacêutica a técnica de liofilização é de grande importância para obter um pó liofilizado capaz de solubilizar rápida e eficazmente e com todas as suas atividades biológicas.

A figura 1 mostra a extração no veneno de cascavel, da qual será purificada a serinoprotease (gioxina) para produção do selante de fibrina heterólogo.



**Figura 1** - Extração do veneno de cascavel. Fonte: UNESP. Assessoria de Comunicação e Imprensa.

A figura 2 ilustra o mecanismo de ação do selante de fibrina na hora do uso, formando uma rede de fibrina. A figura 3, mostra a apresentação da caixa contendo o Selante de Fibrina utilizado nos ensaios clínicos.



**Figura 2 - Mecanismo de ação dos selantes de fibrina<sup>32</sup>.**



**Figura 3 - Apresentação do Selante de Fibrina usado nos ensaios clínicos<sup>32</sup>.**

### 1.1.3 Uso terapêutico do selante de fibrina

O uso da cola de fibrina em cirurgias de alta complexidade faz com que o paciente sangre menos e, conseqüentemente, permaneça menos

tempo nos centros cirúrgicos, diminuindo, também, o período de recuperação do indivíduo. Ainda devido ao seu uso, o paciente necessita de menor quantidade de sangue e seus componentes durante a cirurgia, o que promove, inclusive, a racionalização dos estoques destes insumos. A cola de fibrina não tem restrição de uso, ou seja, pode ser aplicada em crianças, adultos e idosos<sup>12</sup>.

O selante é tão promissor que vários estudos sobre ele mostram o uso terapêutico em muitos outros casos, tais como:

- Úlceras venosas são as principais causas de úlceras crônicas de membros inferiores, uma ferida difícil de tratar e curar. O selante de fibrina funciona como uma estrutura e liberação de drogas com propriedade de cura, ajudando na regeneração e tratamento de úlceras venosas. Os disponíveis no momento são os selantes homólogos, mas já existem experimentos com selantes heterólogos<sup>2</sup>.

A figura 4 mostra os efeitos de um tratamento com selante de fibrina com resultados excelentes, uma área ulcerada de 33,5 cm<sup>2</sup> reduziu para 10,4 cm<sup>2</sup>, ou seja, quase completamente.



**Figura 4** - Paciente do sexo feminino, 66 anos e portadora de quatro UV há um ano. A área ulcerada inicial era de 33,5 cm<sup>2</sup>, a área na visita final era de 10,4 cm<sup>2</sup> (duas úlceras cicatrizaram completamente)<sup>2</sup>.

- Para tratar defeito ósseo, serve como suporte para células tronco mesenquimais. Usando biopolímero de fibrina heteróloga, concluiu-se que é um ótimo arcabouço para células tronco mesenquimais, servindo como estrutura provisória para migração e proliferação celular, angiogênese, formação de tecido conjuntivo e estimula fatores de crescimento<sup>12</sup>.
- Selante de fibrina heterólogo usado como andaime tridimensional para células-tronco mesenquimais. Sucesso na engenharia de tecidos, podendo ser usado na medula óssea, vasos sanguíneos, pele e outros tecidos. Funciona como uma estrutura para proliferação celular sem interferir na diferenciação e mantendo a sobrevivência da célula, pode ser usado na administração de medicamentos<sup>42</sup>.

## **1.2 Liofilização**

A liofilização também denominada criodesidratação ou criosecagem, é uma técnica diferenciada para muitos produtos, pois através de condições especiais de pressão e temperatura, permite que a água previamente congelada e no estado sólido passe diretamente da fase sólida para fase gasosa sem passar pela fase líquida (sublimação)<sup>18</sup>. Assim precisa de uma máquina especial com uma câmara de secagem e uma bomba de vácuo para remoção da água<sup>42</sup>.

Por meio do congelamento do produto, após essa etapa, a câmara de vácuo já existente do equipamento de liofilização, atua reduzindo a pressão circunvizinha e com aumento gradativo da temperatura passando a água congelada (sólida) para gasosa<sup>32</sup>.

O processo de congelamento influencia significativamente no desempenho da liofilização e produto final. O produto a ser processado é

congelado por exposição a temperaturas inferiores ao seu ponto de congelamento<sup>18</sup>.

Pela primeira em 1906, a Académie des Sciences de Paris, Bordas e d'Arsonval demonstrou que era possível secar um produto congelado sob vácuo moderado. Nesse estado seria estável à temperatura ambiente por um longo tempo e os autores descreveram, em um conjunto de notas sucessivas, que esta técnica poderia ser aplicada à preservação de soros e vacinas. A liofilização foi então oficializada, apesar de estar em séculos atrás, pelos incas que secaram sua carne congelada no calor radiante do sol na atmosfera rarefeita do Altiplano<sup>23</sup>.

A secagem foi desenvolvida no século XX (1906), não apenas para material biológico e produtos farmacêuticos, mas também para certos alimentos, e não apenas café instantâneo<sup>23</sup>.

Esse tipo diferenciado de secagem é conhecido a mais de 100 anos, porém era restrito a poucos especialistas interessados em estabilizar bioquímicos delicados. No tempo de guerra foi muito usado para preparar e fornecer plasma humano para os campos de batalha, através da equipe médica. Anos depois, usaram a mesma técnica, mas denominada liofilização, para preparo de antibióticos e muitos medicamentos, produtos químicos e biológicos. Hoje é uma técnica reconhecida e em expansão, com muitas aplicações em diversos produtos, alimentícias ou biológicas. Porém com o aumento e a diversidade de produtos que usam essa técnica, junto cresce a sensibilidade dos produtos e a dificuldade de mantê-los estáveis e com suas propriedades originais. Isso leva a um desafio e muito estudo para conseguir de forma eficaz liofilizar qualquer produto e ainda sim manter todas as suas propriedades<sup>23</sup>.

### 1.2.1 Vantagens da liofilização

A liofilização é efetuada a baixas temperaturas e as atividades e propriedades do produto são mantidas, as perdas dos constituintes voláteis são mínimas, é fácil a redissolução e reprodução das suas condições anteriores, inibe o desenvolvimento de microrganismos degradantes, reações enzimáticas e alterações químicas de microrganismos. A liofilização não é indicada para materiais oleosos ou ricos em açúcares<sup>42</sup>.

Exemplos de produtos liofilizados hoje são: antibióticos, bactérias, soros, vacinas, alimentos, medicamentos para diagnóstico, produtos contendo proteínas e biotecnológicos, células e tecidos e produtos químicos<sup>32</sup>.

### 1.2.2 Produtos liofilizados

- **Produtos lácteos** - por serem sensíveis ao calor, suas características nutricionais são degradadas facilmente e as bactérias lácticas destruídas. A liofilização é uma boa opção em alguns casos obtendo ótimos resultados. Visto que após sua liofilização a umidade, cinzas, pH, sólidos solúveis, acidez, atividade, água e teor de lipídeos se mantiveram estáveis, os parâmetros só mudaram após 2 meses de armazenamento, mas ainda sim são ótimos resultados<sup>28</sup>.
- **Suco de fruta** – Sendo o Brasil o maior produtor de laranja, uma fruta cítrica, barata, repleta de vitaminas, nada melhor do que outras formas de conservação para sua utilização. A liofilização permite o suco de laranja ser processado em baixas temperaturas sem afetar o calor sensível das células, suas vitaminas e proteínas. A laranja é rica em ácido ascórbico, a qual é uma importante vitamina para nossa saúde. Após o processo de liofilização o valor obtido de ácido ascórbico foi de 57,5 mg/100mL,

sendo o valor de referência 60 mg/100mL. Um resultado consideravelmente aproveitável<sup>40</sup>.

### *1.2.3 Estágios da liofilização*

A liofilização é uma técnica com várias fases, onde cada fase é crítica. Para se realizar uma liofilização bem-sucedida, devemos saber a fundo sobre o produto a ser liofilizado, sobre o meio circundante, temperaturas críticas, fornecendo os dados corretos, assim:

- O produto, ou substância "ativa", deve manter sua principal propriedade.
- O “meio” circundante, como agentes de volume, estabilizadores, emulsificantes, antioxidantes, crioprotetores e agentes tamponantes, pois variam de acordo com cada produto.
- O equipamento precisa ser flexível, totalmente confiável e voltado para o este objetivo.
- Saber o objetivo final (produção em massa de medicamentos ou ingredientes estéreis/não estéril, pesquisa experimental, desenvolvimento técnico).
- O processo deve ser adaptado a casos individuais de acordo com os requisitos específicos e comportamento à baixa temperatura dos diferentes produtos em tratamento.
- Os parâmetros finais de condicionamento e armazenamento do produto acabado, que varia não apenas de uma substância para outra, mas também em relação à sua “vida terapêutica esperada” e condições de comercialização, isto é, vacinas para países tropicais remotos, padrões biológicos internacionais. Assim, difere para cada produto<sup>39</sup>.

Assim sendo, não existe uma técnica de liofilização universal para todos os produtos, existe uma pesquisa onde primeiramente se adquire

todos os dados para um determinado produto e este será liofilizado mediante os dados informados.

#### *1.2.4 O ciclo de liofilização*

- A preparação do material (sólido, líquido, pasta, emulsão) a ser processado, tomando muito cuidado para não impedir suas propriedades fundamentais<sup>18</sup>.
- O congelamento do produto a baixas temperaturas, o material é endurecido e todos os fluídos presentes no produto tornam-se corpos sólidos, cristalino, amorfo ou de vidro. Muitas vezes, a água gera um complexo de gelo que pode estar embutida em estruturas de vidro ou permanecer mais ou menos firmemente vinculado às estruturas intersticiais. Solutos fazem concentrados e podem finalmente cristalizar. Devido ao congelamento ocorre a expansão volumétrica do sistema e isso causar tensões que combinam com o choque osmótico causado pelo aumento da concentração de fluidos intersticiais<sup>34</sup>.
- A fase de sublimação ou secagem primária é quando o material congelado, sob vácuo, é aquecido progressivamente para fornecer energia suficiente para o gelo sublimar, ou seja, as condições obtidas devem permitir que o gelo possa ser removido do produto congelado via sublimação, resultando num produto estruturalmente seco e intacto. Isto requer um controle muito cuidado sobre dois parâmetros, temperatura e pressão, envolvidas no processo de liofilização devem ser ajustado entre a entrada de calor (transferência de calor) e a sublimação da água (transferência de massa), para que a secagem possa prosseguir sem causar reações adversas para o material congelado, como derretimento, estofamento ou colapso. Um contínuo e preciso ajuste da pressão operacional é obrigatório para ligar a entrada de calor às “possibilidades evaporativas” do material congelado<sup>18</sup>.

- A fase de secagem secundária ou dessorção é a fase onde removemos a água adsorvida que não foi removida da secagem primária através de um vácuo mais alto para permitir a extração progressiva de água restante, momento que deve ser cauteloso, pois a secagem excessiva pode ser tão ruim quanto à secagem insuficiente. Para cada produto, uma umidade residual adequada deve ser alcançada sob determinada temperatura e pressão<sup>18</sup>.
- O condicionamento e armazenamento finais começam com a extração do produto a partir do equipamento. Durante esta operação, deve-se tomar muito cuidado para não perder as qualidades refinadas que foram alcançadas durante as etapas anteriores. Assim, para os frascos, a rolha sob vácuo ou gás inerte dentro da câmara é prática atual. Para produtos a granel ou em ampolas, a extração pode ser feita em uma câmara de gás apertada ou em um isolador por controle remoto. Água, oxigênio, luz e contaminantes são todos importantes ameaças e precisam ser monitorados e controlados. Exposições a vapor de água, oxigênio (ar), luz, excesso de calor ou materiais não estéreis, os ambientes são os principais fatores a serem considerados. Nesse contexto, a composição e qualidade do próprio recipiente (tipo de vidro, elastômeros, rolhas, membranas plásticas ou orgânicas) devem ser consideradas<sup>18</sup>.
- A fase de reconstituição. Isso pode ser feito de muitas formas diferentes, com água, soluções salinas balanceadas ou solventes para reestabelecer a concentração do produto inicial ou atingir um produto concentrado ou diluído. Para enxertos cirúrgicos ou curativos, procedimentos especiais podem ser solicitados. Também é possível usar o produto como tal, no estado seco, em um processo subsequente de extração por solvente quando bioquímicos muito diluídos precisam ser isolados de uma grande massa, como é o caso dos invertebrados marinhos<sup>18</sup>.

### *1.2.5 Princípios do Processo de liofilização*

Alguns aspectos importantes que devem ser considerados durante o processo de liofilização, as condições em que o processo ocorre determinarão a qualidade do produto liofilizado.

- **Congelamento**

Trata-se da temperatura tal que permita a menor quantidade possível de água por congelar, retirando o calor e criando um estado que seja adequada para a próxima fase, a secagem por sublimação<sup>41</sup>.

A fase de congelamento deve ser controlada para não criar uma barreira de gelo que atrapalha a sublimação e conseqüentemente a redissolução do produto final seco, a técnica de congelamento, assim como sua taxa influenciam na morfologia dos cristais de gelo formados na fase de congelamento. O resfriamento de produto aquoso produz núcleos de cristal. A água que está em volta é fixada ao redor dos locais de nucleação, formando cristais de diferentes tamanhos e formas. O tamanho dos cristais determina o tamanho dos poros que serão criados durante a secagem que vem a seguir. Grandes cristais de gelo criam grandes poros, o que leva a uma rápida sublimação da água durante a secagem primária, porém na secagem secundária pode causar lentidão devido a menor área de superfície formada, dificultando a saída da água nessa etapa<sup>38</sup>. A velocidade de congelamento, a composição do produto, a quantidade de água, a viscosidade do líquido e a presença de substâncias não cristalizadas são fatores que determinam a forma e tamanho dos cristais, o que influencia no processo de sublimação. Assim, pequenos cristais de gelo e sua distribuição, produzem espaços pequenos no produto seco diminuindo a remoção do vapor de água, o que resulta na porosidade e textura do produto final liofilizado e leva a uma lenta liofilização<sup>32</sup>. Controlando a taxa de congelamento, controla-se o tamanho dos cristais.

O ponto de congelamento da água pura é de 0°C, ou seja, quaisquer outras substâncias misturadas na água diminuirá o ponto de congelamento, quando há presença de sais inorgânicos, pode ser mais baixo ainda. Assim a composição do material a ser liofilizado varia caso a caso e deve ser levado em conta na seleção da técnica de congelamento mais adequada e seus parâmetros reconhecidos antes da secagem por sublimação<sup>32, 34</sup>.

O comportamento do congelamento do produto pode ser investigado, o liofilizador deve ser capaz de ajustar a taxa de congelamento ao produto específico e controlar a velocidade do congelamento<sup>32</sup>.

- **Secagem Primária (Sublimação)**

Controlando a pressão do vácuo e o aumento da temperatura<sup>39</sup>. No início da secagem primária, a sublimação da água ocorre na superfície do produto e depois se volta para o produto. A sublimação dos cristais de gelo ocorre até não ter mais cristais, só então a água ligada ao produto passa pelo processo de dessorção, como uma maneira forçada para retirada final de água, mantendo a estrutura da proteína e sua função biológica. O processo de secagem depende do calor necessário para sublimação e da velocidade de transferência e remoção. A pressão na câmara de secagem é ajustada durante a secagem primária para o maior valor admissível. O calor da sublimação não é necessário na superfície do produto, mas no interior do núcleo, que se retira para o exterior do produto conforme a secagem avança. Devido à baixa condutividade térmica das camadas de produto seco, a gradiente de temperatura necessário para transferência de calor aumenta de forma constante, assim a temperatura máxima possível para aquele produto não pode ser ultrapassada para evitar danos ao produto, deve-se manter a temperatura de sublimação necessária durante toda a secagem, ou seja, manter o fornecimento de calor no limite do núcleo do gelo em

equilíbrio e evitar o superaquecimento da zona de sublimação até que todo o gelo no produto tenha sido sublimado<sup>32</sup>.

- **Secagem Secundária (Dessorção)**

Nessa etapa o teor de umidade residual é reduzido ao máximo possível a fim de assegurar que o produto esteja em um estado que propicie maior preservação em armazenamento. A água que adere por adsorção na superfície interna do produto tem que ser removida. É a fase delicada onde o controle do gradiente de pressão e a temperatura não podem exceder para não causar danos ao produto. O processo deve ser controlado para evitar o excesso de secagem do produto<sup>32</sup>.

Essa água residual ou combinada está associada à estabilidade da amostra, a remoção excessiva pode alterar a configuração da proteína e sua funcionalidade. O teor residual de água deve ser retirado até o ponto que não afete a água ligada que está associada à natureza do constituinte ativo<sup>42</sup>.

Nesta fase há o perigo de ocorrer colapso, ou seja, quando a viscosidade do material decresce em função do aumento da temperatura, conseqüentemente o material não se sustenta.

- **Armazenamento do produto seco**

O conteúdo residual de água no produto seco é um fator crítico que afeta a vida do produto em armazenamento, os produtos são higroscópicos e possuem sensibilidade à oxidação, embalagens a vácuo ou em atmosfera protetora de gás inerte ou CO<sub>2</sub> são normalmente usadas<sup>41</sup>.

O armazenamento é tão importante quanto as outras fases, pois protege o produto final da luz, vapor e umidade. É realizado de acordo com as “sensibilidades” específicas de cada produto. As exposições não

controladas ao vapor de água, oxigênio (ar), luz, excesso de calor, ou ambiente não estéril são os principais fatores a serem considerados. A composição e a qualidade do próprio recipiente (tipo de vidro, elastômeros das rolhas, plástico, ou membranas orgânicas) devem ser consideradas também.

Caso a liofilização do produto ocorra em garrafas, frascos ou ampolas são muito importantes fechar esses recipientes imediatamente após a secagem. Para este efeito, rolhas de borracha com tiras especiais são colocadas no gargalo das garrafas, frascos são firmemente pressionadas nos gargalos por um dispositivo de rolhamento<sup>32</sup>. Os recipientes podem ser selados sob vácuo ou atmosfera de gás de proteção.

A escolha do método depende do produto. É aconselhável, em qualquer caso, ventilar a câmara de secagem com nitrogênio seco ou gás inerte (até à pressão atmosférica) no final do processo e não usar ar muito úmido para ventilação<sup>32</sup>.

O meio de transporte dos frascos liofilizados também conta, pois, dependendo das condições de pressão, temperatura e agitação, o transporte inadequado pode causar perda da amostra.

Assim, com todos os cuidados esse produto poderá ser usado conforme sua necessidade. Sua reconstituição, pode ser feito com água, soluções salinas balanceadas, ou solventes para restaurar a concentração do produto inicial ou para atingir um produto mais concentrado ou diluído.

Na figura 5, é possível ver como são apresentados produtos liofilizados após todas as fases de liofilização, já acondicionados em frascos de vidro fechados com tampa para não sofrer efeito externo e poderem ser transportados e usados.



**Figura 5** - Produtos liofilizados em perfeitas condições<sup>30</sup>.

- **Colapso**

O colapso é caracterizado pela perda de estrutura do produto durante a secagem primária, como na secundária ou durante o armazenamento, o que pode levar a redução do tamanho médio dos poros e da porosidade, e aumento da densidade, normalmente é prejudicial para a qualidade do produto liofilizado<sup>42</sup>.

O início do colapso pode ser regulado pela viscosidade do sistema liofilizado na qual é afetada pela temperatura do produto acima da temperatura crítica, pressão da câmara e temperatura da prateleira, pelo tempo de secagem (o tempo que as lamelas que se encontram entre os cristais de gelo levam para secar) e diâmetro dos poros do liofilizado. A maioria dos métodos para determinar a  $T_c$  é pelo julgamento óptico da amostra pelo operador<sup>42</sup>.

- **Otimização do ciclo de liofilização primária**

A otimização é importante, pois diminui os custos e gera ciclos de liofilização mais curtos. A técnica é baseada no conhecimento da temperatura crítica de formulação (transição vítrea( $T_g$ ) ou temperatura de colapso( $T_c$ )). O alvo é controlar o fluxo de calor para o produto, evitando situações onde a temperatura do produto exceda a temperatura crítica

para determinado produto e conseqüentemente entrar em colapso, ou seja, a estrutura do produto descongelar, o que afetaria a qualidade do produto liofilizado<sup>26</sup>.

Este processo é repetido até encontrar a temperatura que estabelece a temperatura crítica de formulação do produto, controlando entre 3 a 5°C abaixo desta margem crítica como medida de segurança. É importante não deixar que esta margem de segurança se torne muito grande, sendo que a cada 1°C a mais durante a liofilização, o ciclo primário poderá ser reduzido em até 13%<sup>26</sup>.

Existe uma tecnologia mais eficiente e de menor custo (SMART) disponível para o desenvolvimento e otimização de ciclos. A tecnologia SMART foi desenvolvida pela Universidade de Connecticut e a Universidade de Purdue através do Centro de Pesquisa de Processos Farmacêuticos (CPPR); a tecnologia foi licenciada à SP Scientific e incorporada ao liofilizador Lyostar 3<sup>12,26</sup>.

### *1.2.6 Pontos críticos analisados na liofilização*

- **Temperatura de transição vítrea (Tg)** – Temperatura na qual ocorre a vitrificação do material amorfo, este passa de um estado relativamente “borrachento” com mobilidade para um estado vítreo sem mobilidade. É a transição reversível em materiais amorfos (não possui estrutura definida), entre um estado duro e relativamente rígido e um estado mole, é caracterizada pelo aumento da viscosidade, onde a mobilidade molecular diminui bruscamente, impedindo a cristalização<sup>4</sup>. Abaixo da Temperatura de transição vítrea o material encontra-se em um estado vítreo em que sua energia interna não é suficiente para que ocorram as reações enquanto ela tem mobilidade. Qualquer substância que estiver numa temperatura abaixo de sua Tg apresentará o comportamento mecânico de um sólido rígido.

- **Temperatura Eutética** - O ponto em que os componentes estão sólidos por estarem totalmente congelados.
- **Temperatura de colapso** - Ocorre quando a viscosidade do material decresce em função do aumento da temperatura, conseqüentemente o material não pode se sustentar uma vez que o gelo dendrítico (forma dos cristais) que dava suporte foi sublimado. O colapso ocorre na interface da liofilização.
- **Temperatura de fusão** – Todo o produto está no estado líquido<sup>6</sup>.

### *1.2.7 Efeito de tampões, ligantes e estabilizadores na formulação*

Um modelo de formulação para liofilização de proteínas pode incluir componentes, como: um tampão que não acidifica durante o congelamento (Tris, histidina, citrato), ligantes/pH específicos que otimizam a estabilidade termodinâmica da proteína, um estabilizador (geralmente um dissacarídeo como sacarose ou trealose) para inibir o desdobramento e fornecer uma matriz vítrea, um agente de volume (manitol, glicina, amido hidroxietílico ou dextrano) para garantir a estabilidade física e uma surfactante para reduzir a agregação de proteínas<sup>23</sup>. Cada formulação depende da composição e necessidade do produto, pode ocorrer de não precisar de adicionais á formulação.

Dentre os crioprotetores mais comuns na literatura estão os açúcares tais como glucose, sacarose, manitol, trealose, lactose, e polímeros tais como o álcool polivinílico e a gelatina que são utilizados para melhorar a qualidade dos pós liofilizados. Vale ressaltar, que a quantidade do crioprotetor a ser adicionada varia de formulação para formulação que pode ser de 2% até 30% (p/v) como referência, principalmente para formulações para via oral<sup>3</sup>.

Foi observado eficácia na trealose endógena e também o uso da trealose como crioprotetor na liofilização de cepas de leveduras. Observou-se bons resultados na manutenção da viabilidade de células e leveduras que passaram por processo de liofilização. Cepas da levedura

*Saccharomyces cerevisiae* e da levedura *Saccharomyces boulardii* passaram por um tratamento de acúmulo da trealose endógena, através de tratamento térmico a 45°C por duas horas em meio tampão citrato de potássio 2M, pH 4,0, acrescido de 2% de glicose, e também, foram suspensas em cada uma de três soluções crioprotetoras, como o leite desnatado a 10%, a sacarose a 10% e a trealose a 10%. Após isso, as massas de levedura foram liofilizadas e avaliadas as suas viabilidades. As culturas de levedura que passaram pelo tratamento de acúmulo da trealose endógena apresentaram maior viabilidade após a liofilização do que aquelas que não passaram pelo tratamento. Já entre os crioprotetores testados, a solução de leite desnatado a 10% foi o que proporcionou melhor crioproteção às células de levedura<sup>17</sup>.

Um ligeiro aumento ou diminuição de um dos os excipientes podem levar a alterações significativas no estado físico da formulação e no comportamento durante o congelamento e a secagem. Os excipientes podem ter um efeito positivo ou negativo. Impacto positivo nas propriedades térmicas e especialmente no valor de T máx. A composição da formulação é importante para o desenvolvimento de uma solução robusta e curta. A otimização do processo de liofilização está integrada na etapa de desenvolvimento da formulação<sup>23</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Padronizar a técnica de liofilização dos componentes do Selante de Fibrina Heterólogo do CEVAP/UNESP.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar as análises das temperaturas envolvidas no processo de liofilização do crioprecipitado obtido do sangue de búfalos e da giroxina purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

- Analisar a necessidade de tampões e estabilizantes para otimizar a técnica de liofilização sem prejuízo aos efeitos biológicos da amostra.
- Realizar a liofilização dos componentes crioprecipitado e giroxina do Selante de Fibrina Heterólogo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) sob nº\_04/2019 (Anexo 01), e seguiu, de maneira estrita, os critérios e princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA).

#### **3.2 Obtenção do Selante de Fibrina**

O selante de fibrina derivado de veneno de serpente foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente projeto.

Assim, foram analisadas individualmente duas amostras dos seguintes componentes do Selante de Fibrina.

- Crioprecipitado rico em fibrinogênio obtido a partir de sangue de búfalos (*Bubalus bubalis*) adultos.
- Giroxina purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

#### **3.3 Equipamentos e técnicas utilizadas**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

da USP, sob a coordenação do Prof. Dr. Marco Antonio Stephano, e também no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo – Central Analítica.

- **DSC Q20** com acessório de resfriamento RCS 90 - utilizada uma técnica de calorimetria exploratória diferencial, um método termo-analítico que pode medir, caracterizar e analisar as propriedades térmicas e determinar a capacidade calorífica (quantidade de calor necessária para elevar a sua temperatura de 1°C), entalpias (energia térmica envolvida em uma reação), e transição de fases. Os resultados são obtidos por gráficos que mostram as temperaturas necessárias para a liofilização<sup>9</sup>.
- **FDM – Freezer Drying Microscopy** - Microscopia óptica acoplada à liofilização que pode determinar a temperatura de cristalização da água presente no material (T crist.), temperatura de colapso (Tc) e a temperatura de fusão dos cristais de gelo (Tm). Este equipamento ajuda a confirmar os resultados obtidos pelo DSC. Age como um micro liofilizador, pois colocando-se uma pequena quantidade de amostra do produto em uma câmara sob o microscópio, o material é congelado, sofre pressão e secagem, todas as fases são vistas em tempo real, capturada pela câmara e gravadas, mostrando assim as temperaturas e todo processo, sendo assim, pode-se ver pelo computador o processo de liofilização em tempo real e todas as suas fases, desde a formação dos primeiros cristais de gelo e a formação dos poros após sublimação<sup>38</sup>.

Para o teste no DSC, houve calibração prévia do equipamento com metal índio, pesagem das amostras em cadinhos de alumínio que são fechadas com tampas também de alumínio usando a prensa específica do equipamento, esta

pesagem é inserida no programa para que as conversões possam ser calculadas. Após isso, aplica-se o programa de aquecimento escolhido para este estudo.

- 1: Estabilização da amostra a 20,00 °C
- 2: Tempo de estabilização 1 min
- 3: Rampa de resfriamento a 10 °C / min de + 20 °C até -70 °C
- 4: Tempo de estabilização a -70 °C por 1,00 min
- 5: Rampa de aquecimento a +10 °C / min de -70°C a 28 °C

A figura 6 mostra um equipamento DSC Q20 da TA Instrumentos, utilizado para a técnica para caracterizar e analisar as propriedades térmicas e determinar a capacidade calorífica.



**Figura 6** - TA Instrumento DSC Q20 no Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

### **3.4 Processo e pontos críticos analisados**

#### *3.4.1 Crioprecipitado*

#### **FASE DE RESFRIAMENTO DA AMOSTRA**

O resfriamento do crioprecipitado no DSC após pesagem do material pelo equipamento e já calculado, se deu à 20°C à uma taxa de resfriamento de 10°C por minuto, com temperatura final de -70 °C. As etapas do resfriamento que seguem no processo sugerem as temperaturas da liofilização.

## **FASE DE AQUECIMENTO DA AMOSTRA**

Após a amostra chegar ao resfriamento de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , iniciou-se o aquecimento com temperatura final de  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A secagem primária foi encontrada à  $-35^{\circ}\text{C}$ , onde o produto se encontra no estado totalmente sólido (congelado), e portanto, este seria o ponto ideal para que o vácuo atue, para que ocorra a secagem primária.

### *3.4.2 Giroxina*

## **FASE DE RESFRIAMENTO DA AMOSTRA**

O resfriamento da giroxina no DSC após pesagem do material pelo equipamento e já calculado, se deu a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  à uma taxa de resfriamento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  por minuto, com temperatura final de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As etapas do resfriamento seguem encontrando as temperaturas que sugerem a liofilização da Giroxina.

No início do resfriamento, a temperatura baixou até  $-22,71^{\circ}$ , neste ponto a água começou a cristalizar, mas ainda possui certa viscosidade, o que impede a cristalização, assim o processo precisou liberar calorías ( $283,0\text{J/g}$ ) para endurecer totalmente, chegando assim a  $-11,18\text{ }^{\circ}\text{C}$  que seria a temperatura do Ponto Eutético. Após isso, iniciou-se o aquecimento.

## **FASE DE AQUECIMENTO DA AMOSTRA**

Após a amostra chegar ao resfriamento de  $-70^{\circ}\text{C}$ , iniciou-se o aquecimento com temperatura final de  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nessa amostra conseguimos apenas o registro dos pontos de transição vítrea (dois registros) e ponto de fusão.

As temperaturas de transição vítrea foram encontradas seguindo o aquecimento, A primeira transição vítrea registrada foi -57 °C e a segunda a -22,94 °C. As temperaturas registradas na primeira transição vítrea foi de -61,65 °C, e precisou de 1.213J/g de calor para chegar até -57 °C e a segunda foi -24.87 °C e precisou de 9.040 J/g calor para chegar até -22,94 °C.

Ponto de fusão foi encontrado a 1 °C onde o produto estava todo no estado líquido, sendo assim essa temperatura foi denominada temperatura de fusão da Giroxina.

### **3.5 Temperatura de colapso**

Para a determinação da temperatura de colapso das amostras, crioprecipitado e giroxina, foram analisados em *FDM – Freezer Drying Microscopy*, aplicando a seguinte metodologia:

Foram analisados 1 mL de cada amostra em sistema de congelamento aplicando as seguintes temperaturas:

- Estabilização da mostra a 10 °C por 1 min;
- Rampa de resfriamento a 10 °C por min de +10 °C até -60 °C;
- Estabilização da amostra a -60 °C por 1min;
- Rampa de aquecimento a 10 °C por min de -60 °C até +5 °C.

A avaliação das fotos sequenciais obtidas por meio do FDM (Figura 5) em formato de vídeo nos orienta em que momento exato cada amostra sofre colapso. O colapso pode atrapalhar uma liofilização, levando à desestabilização das amostras.

A figura 7 mostra um FDM – *Freezer Drying Microscopy* – Equipamento de microscopia óptica acoplada à liofilização que pode determinar a temperatura de cristalização da água presente no material (T crist.), temperatura de colapso (Tc) e a temperatura de fusão dos cristais de gelo (Tm).



**Figura 7** - FDM – *Freezer Drying Microscopy* do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Freezer Drying Microscopy - FDM**

As temperaturas registradas pelo Lyostat em *Freezer Drying Microscopy* totalmente integrado nos permitiu registrar eventos como colapso, derretimento e formação de cristais de gelo nas amostras. Assim, através de um microscópio focado na amostra e controlado por vácuo, registrou-se por imagens de captura e vídeos todo o comportamento da amostra, desde o congelamento e secagem<sup>20, 37</sup>. Este processo é visual e as temperaturas são registradas durante todo o processo que é controlado por um computador, mostrando com exatidão o momento a amostra congelou e em qual temperatura. Desta maneira, foi possível encontrar a temperatura de transição vítrea do crioprecipitado e da gioxina, temperatura tal, necessária para realização da secagem primária na fase de aquecimento. Podemos ver também se a amostra colapsou ou não, bem como a temperatura de fusão.

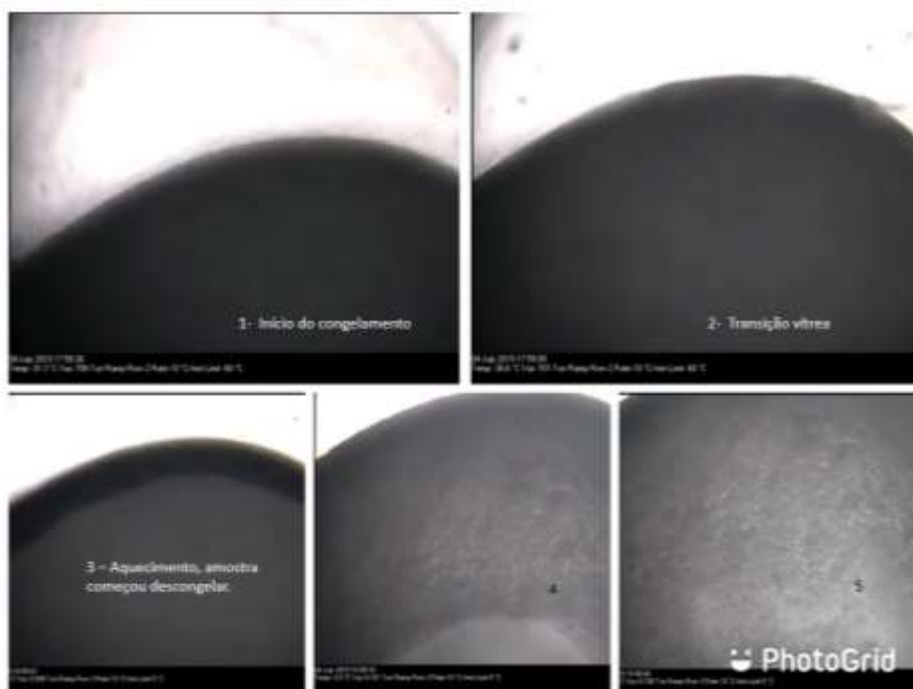
### **4.2 Crioprecipitado analisado pelo FDM**

- **Amostra 1 – teste 1**

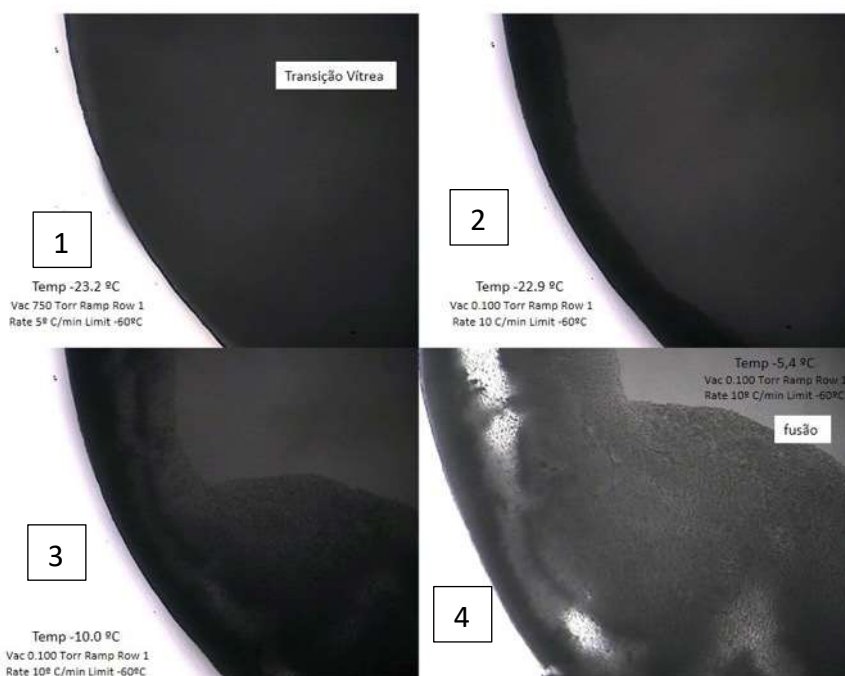
Os resultados obtidos na primeira amostra foram as temperaturas de  $-31,3^{\circ}\text{C}$  no início do congelamento e aos  $-36,6^{\circ}\text{C}$  encontrou-se a transição vítrea, que revela a temperatura em que a amostra se encontra completamente congelada. Dando sequência, iniciou o aquecimento e a amostra se liquefaz a  $1,9^{\circ}\text{C}$ . Este processo visual pode ser verificado pelo microscópio como mostrado na figura 8.

- **Amostra 2 – teste 2**

Os resultados obtidos na segunda amostra (figura 9), mostraram que as temperaturas encontradas foram de  $-22,9^{\circ}\text{C}$  no início do congelamento, de  $-23,2^{\circ}\text{C}$  na transição vítrea, e a fusão a  $-5,4^{\circ}\text{C}$ . Pudemos verificar diferença nas temperaturas da primeira e segunda amostra que pode estar relacionada à concentração dos componentes presentes no crioprecipitado como plasma, albumina e fibrinogênio. As figuras 8 e 9 mostram a sequência ao longo do tempo e suas temperaturas.



**Figura 8** - Sequência de congelamento do crioprecipitado no FDM – amostra 1.

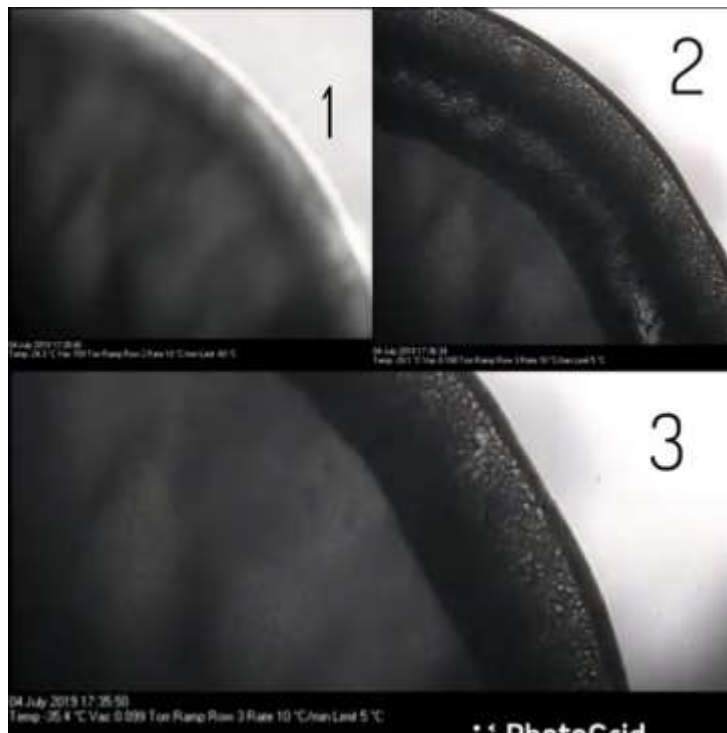


**Figura 9** - Sequência de congelamento do crioprecipitado com as temperaturas registradas no FDM – amostra 2.

### 4.3 Giroxina analisada pelo FDM

- **Amostra 1 – teste 1**

Os resultados obtidos na amostra de giroxina foram às temperaturas de  $-24.3^{\circ}\text{C}$  no início do congelamento e aos  $-35.4^{\circ}\text{C}$  encontrou-se a transição vítrea, que revela a temperatura em que a amostra se encontra completamente sem mobilidade. Porém a  $-28.1^{\circ}\text{C}$  a amostra colapsou. Esta amostra de giroxina mostrou que não foi possível realizar a liofilização com material *in natura*, sem conservantes ou tampões. Este processo visual pode ser verificado pelo microscópio como mostrado na figura 10.



**Figura 10** - Sequência de congelamento da amostra de gioxina com as temperaturas registradas no Freezer Drying Microscopy.

Estudos mostraram que a albumina sérica humana combinada com sacarose, solventes e outros produtos químicos, apresentou a temperatura de  $-35\text{ °C}$  como a temperatura de secagem primária apropriada para este liofilizado, evidenciando pastilhas liofilizadas visualmente elegantes com integridade estrutural não colapsada<sup>20</sup>. Neste estudo, não foram utilizados crioprotetores, o que pode ter afetado no sucesso da liofilização, pois o resultado foi bolo liofilizado ou pastilhas encolhidas e quebradiças, mas ainda sim liofilizadas, esse produto final ainda não é satisfatório como ideal para indústria farmacêutica, pois não nos dá um material de fácil ressuspensão.

#### **4.4 Análises com DSC Q20**

Os resultados obtidos pelo DSC confirmam os resultados obtidos pelo FDM. Na fase de aquecimento, encontramos as temperaturas de transição vítrea e ponto de fusão.

A partir da temperatura de transição vítrea foi possível orientar a temperatura correta para assim iniciar a secagem primária, sempre mantendo uma margem de segurança entre 3 a 5°C abaixo da temperatura crítica para que não ocorra colapso da amostra. É preciso determinar o fim da secagem primária para somente assim dar continuidade ao processo. Esse procedimento ajuda a otimizar a liofilização<sup>30</sup>.

Dentre as três etapas da liofilização, a secagem primária é a etapa mais longa e, portanto, a otimização desta etapa é o foco da indústria<sup>19,29</sup>. É nesta fase que o vácuo atua para iniciar a secagem primária, e assim, inicia-se a retirada da água existente no produto. Esta fase é crítica e deve haver equilíbrio, pois a retirada rápida faz com que as moléculas do produto fiquem num estado vítreo. Isto é importante para conservação das amostras avaliadas neste estudo, pois não foram utilizados tampões ou crioprotetores para esta análise, assim as temperaturas registradas são de amostras puras, ou seja, sem crioprotetores ou tampões<sup>25, 29</sup>.

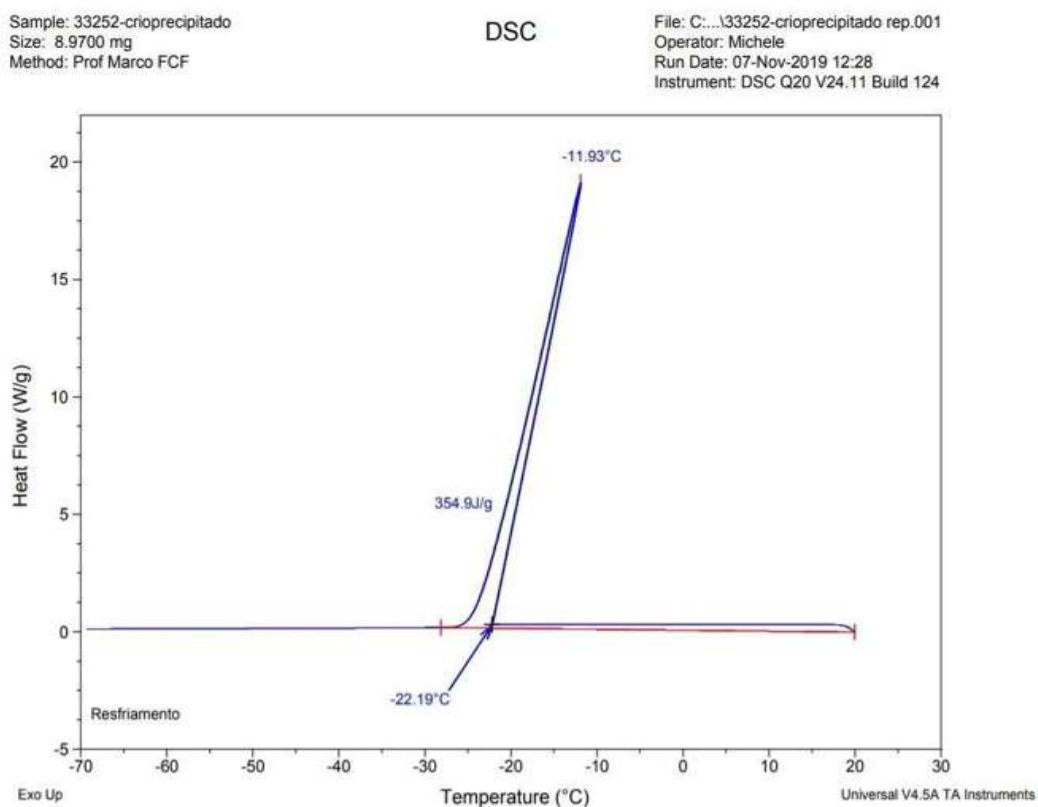
Atualmente, a liofilização é umas das melhores alternativas para a conservação de muitos produtos, porém, o processo envolve muitas tensões térmicas que podem afetar na estabilidade do produto. Assim, a tarefa mais importante é desenvolver formulações que podem conter tampões, agente de volume, estabilizantes, entre outros para aperfeiçoar tal processo e assim, encontrar as temperaturas envolvidas.

#### *4.4.1 Crioprecipitado*

#### **FASE RESFRIAMENTO DA AMOSTRA ANALISADO PELO DSC**

O primeiro teste realizado com amostra 1 de crioprecipitado, sugere o encontro do ponto eutético a uma temperatura de -11,93°C. Inicialmente a temperatura baixou até -22,19 °C, neste ponto a água

começou a cristalizar, tendo assim uma aparência sólida, mas estando ainda no estado líquido, apresentando um aumento de viscosidade, o que impede a cristalização, para cristalizar totalmente e ficar completamente duro, precisou chegar à temperatura de  $-11,93^{\circ}\text{C}$ , o que seria seu ponto eutético. Este processo pode ser visto verificado na Figura 11.

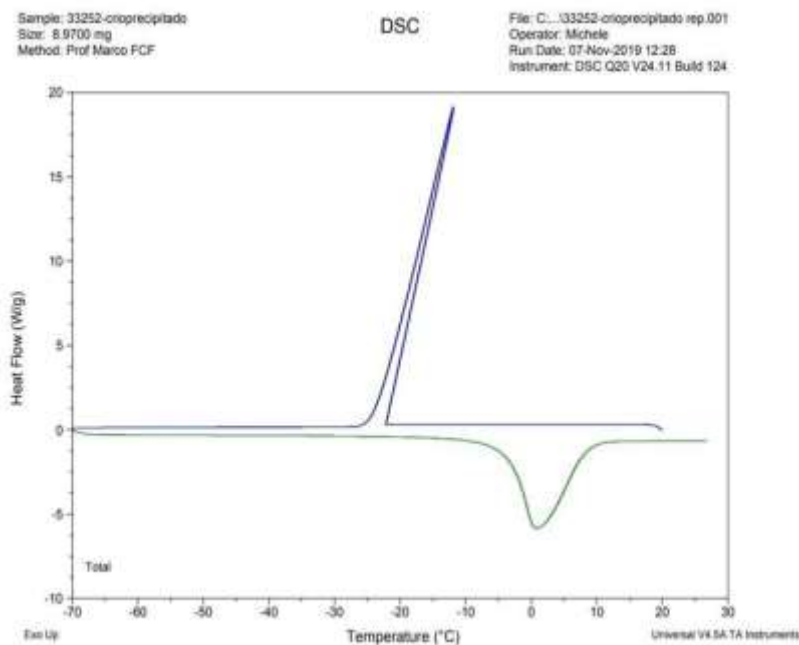


**Figura 11** - Ponto eutético/resfriamento do crioprecipitado.

É preciso lembrar, que a fase de congelamento é tão importante quanto à de aquecimento, o tempo de resfriamento, assim como a temperatura interferem nos poros formados nos cristais de gelo, ou seja, interfere na matriz vítrea, o que interfere no processo de liofilização, como já foi falado anteriormente. Podendo assim, ter como resultado uma pastilha ou *cake* liofilizado com uma aparência encolhida, não uniforme e com algumas rachaduras, por fim, esse produto não elegante resultante de uma liofilização, não nos fornece o resultado esperado<sup>8, 11</sup>.

A amostra então seguiu com diminuição de temperatura até  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  no processo, sendo então iniciado o seu aquecimento.

Na figura 12, é possível se verificar ver as duas curvas no mesmo gráfico, o resfriamento e o aquecimento.



**Figura 12** - Aquecimento/Resfriamento do crioprecipitado.

## **FASE DE AQUECIMENTO ANALISADO PELO DSC**

### **● Amostra 1 – teste 1**

Após a amostra chegar ao resfriamento de  $-70^{\circ}$ , iniciou-se o aquecimento com temperatura final de  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **A) Ponto de colapso do crioprecipitado**

Nesta amostra pudemos avaliar em que momento poderia ocorrer o ponto de colapso, quando a viscosidade do material decresce em função do aumento da temperatura, conseqüentemente o material não pode se sustentar uma vez que o gelo dendrítico adjacente foi sublimado.

A temperatura crítica para este evento seria então, na interface da liofilização a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Como o crioprecipitado estava totalmente congelado, essa fase é crítica, pois é onde pode ocorrer erro e atrapalhar todo o processo de liofilização. A temperatura de colapso deve ser evitada, controlando o fluxo de calor para o produto, evitando que a temperatura do produto exceda a temperatura crítica para o crioprecipitado. O colapso desestrutura o produto e afeta a qualidade do crioprecipitado liofilizado. Nesta amostra, o colapso não ocorreu e o material se manteve estável.

O colapso da matriz sólida é observado na fase de transição vítrea (aquecimento), na interface da liofilização, quando o gelo é sublimado a uma temperatura acima da permitida, perdendo a estrutura da matriz sólida, sem apoio do gelo, esta mistura colapsa, perde sua estrutura porque o líquido viscoso flui para as cavidades do gelo existente. Devido a essa reação há uma obstrução dos poros, o que impede a saída de vapor<sup>11</sup>.

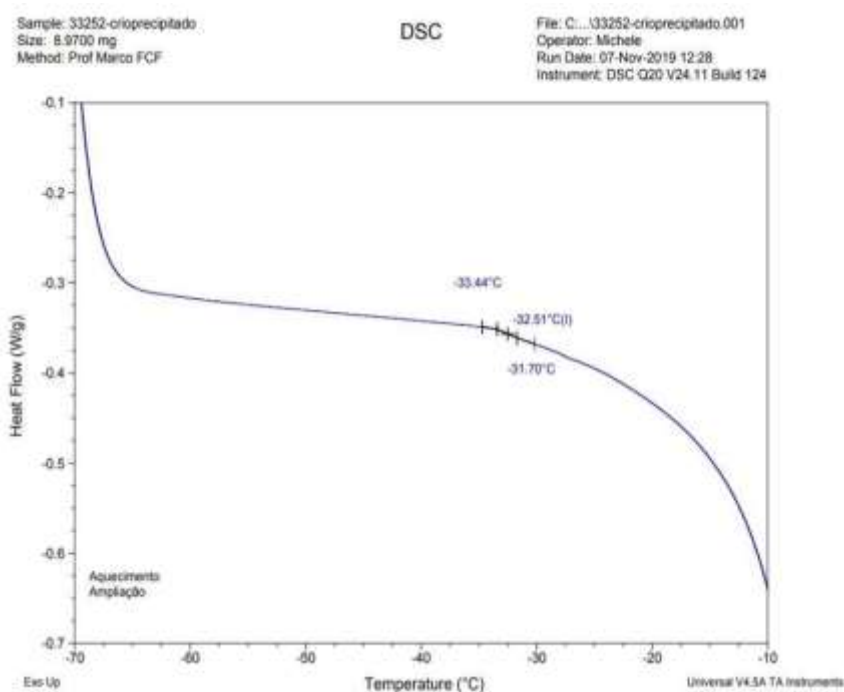
## **B) Secagem primária do crioprecipitado (Sublimação)**

### **TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA**

Entre a secagem primária e a secundária, as temperaturas encontradas pelo DSC, mostraram o momento certo do processo onde atua o vácuo no equipamento liofilizador, para a retirada de aproximadamente 95% da água existente na amostra, ou seja, a maior parte de água existente na amostra. A temperatura de transição vítrea foi de  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 13). Neste momento temos o início da liofilização com a duração média em torno de 48 horas que varia dependendo do material.

Após isso há mudanças de temperatura até chegar a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  muito rapidamente. A temperatura crítica de formulação do crioprecipitado não deve exceder entre 3 a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  abaixo da margem das temperaturas registradas como medida de segurança, e no caso do crioprecipitado a temperatura de transição vítrea se manteve estável. As temperaturas

registradas nessa fase de sublimação foram de -33 °C, 44 °C, -32,51 °C, e -31,70 °C, quando o produto continua com aparência sólida, porém ainda se encontra em estado líquido. Neste estágio, o produto mostrou aparência sólida, mas o crioprecipitado estava no estado líquido. É a transição reversível em materiais amorfos (não possui estrutura atômica definida), entre um estado duro e relativamente rígido e um estado mole, é caracterizada pelo aumento da viscosidade, onde a mobilidade molecular diminui bruscamente, impedindo a cristalização. Conhecendo-se a temperatura crítica da formulação, ela não excede e não entra em colapso.



**Figura 13** - Transição vítrea/Aquecimento do crioprecipitado.

### **C) Secagem secundária do crioprecipitado (Dessorção)**

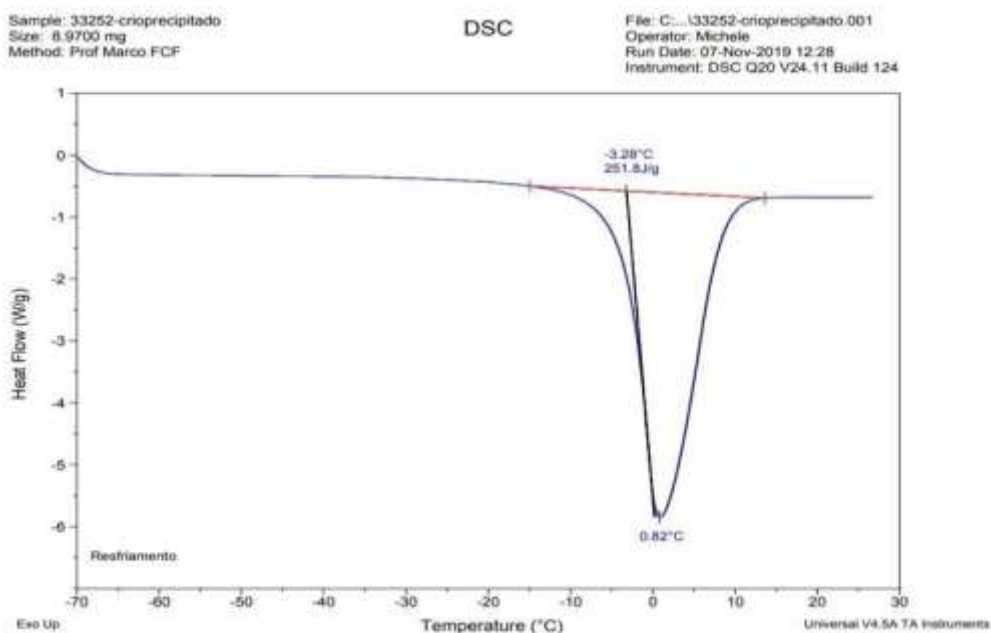
Após a retirada de 95% da água da amostra, a retirada dos 5% restante de água entre as moléculas da amostra ocorreu de forma eficaz. Este é um processo forçado para remoção de água que fica retida e interagindo com o produto, a temperatura desta etapa ocorreu de -35 °C

a 8 °C muito rapidamente e a pressão é bastante reduzida como uma forma de forçar a retirada da água, tem a duração entre 6 a 8 horas. A umidade residual foi resumida ao máximo possível para assegurar que o produto esteja em um estado de armazenamento permanente, porém tendo ainda um controle do gradiente de pressão e de temperatura para que esta não exceda para não causar danos ao produto. É uma fase delicada, mas houve estabilidade e não ocorreu colapso.

#### D) Ponto de fusão do crioprecipitado

O ponto de fusão foi encontrado na sequência da fase de aquecimento, onde a amostra começa a ficar líquida e finalmente todo o produto está no estado líquido.

Na temperatura de -3,28 °C a amostra começou a ficar líquida, havendo perda de calor (251,8 J/g) chegando à 0,82 °C onde todo o produto chega ao estado líquido, considerado este portanto o ponto de fusão do crioprecipitado (Figura 14).



**Figura 14** - Temperatura de Fusão do crioprecipitado.

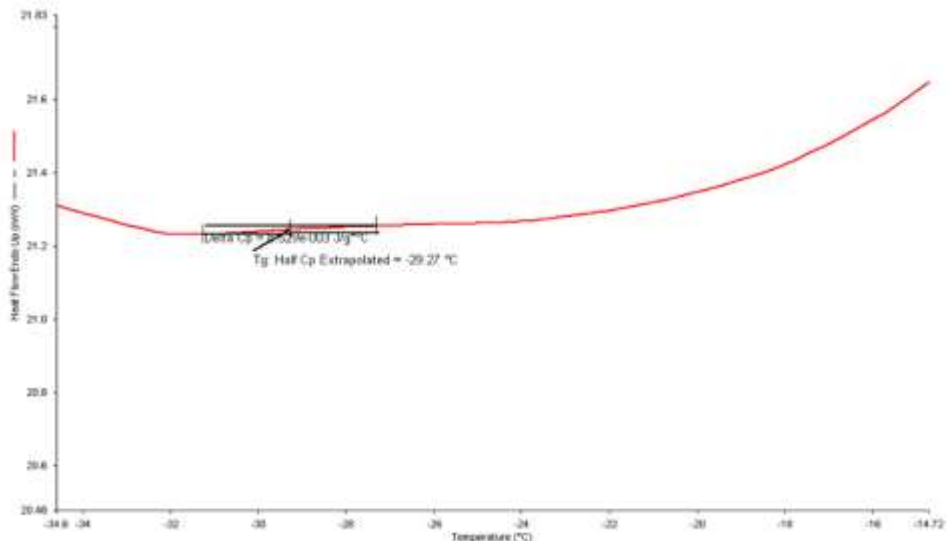
- **Amostra 2– teste 2**

### **E) Secagem primária do crioprecipitado (Sublimação)**

#### **TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA**

As temperaturas registradas nessa fase de sublimação foram de 23,2°C; - 24,2°C e -31°C quando o produto continuava com aparência sólida, mas se encontrava no estado líquido, e assim encontramos o ponto de transição vítrea a – 29,27°C.

Na figura 16 a seguir, podemos ver a temperatura de transição vítrea encontrada no segundo teste da segunda amostra.



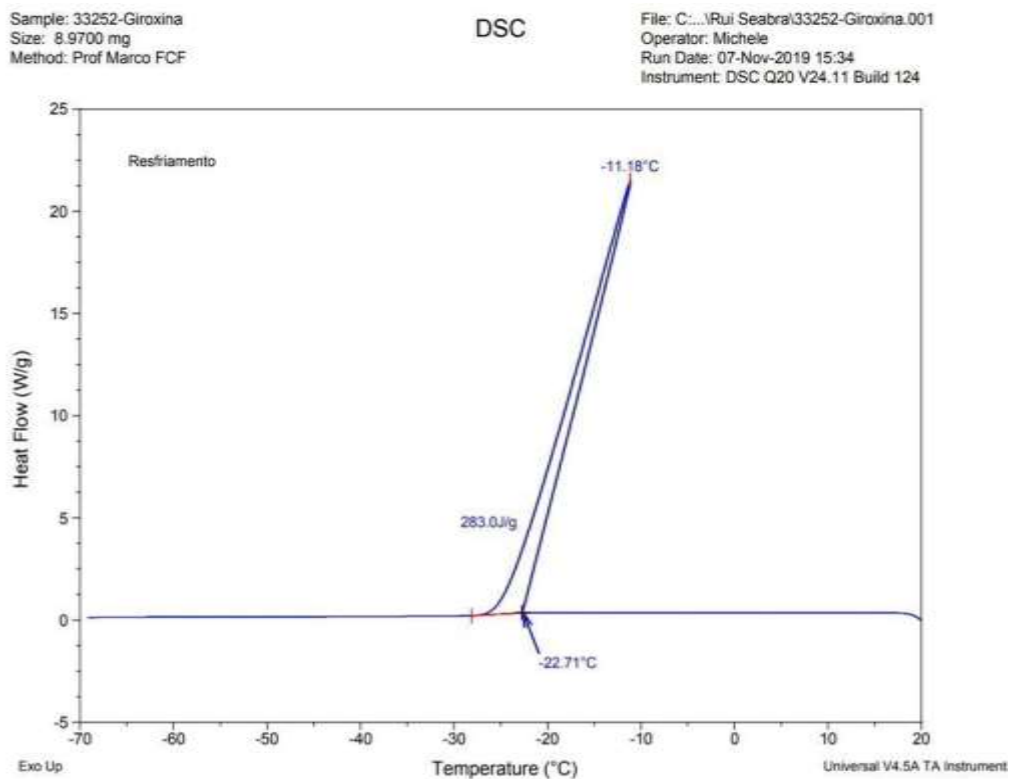
**Figura 15** - Temperatura de transição vítrea da amostra 2 do crioprecipitado.

#### **4.4.2 Giroxina**

##### **FASE RESFRIAMENTO DA AMOSTRA**

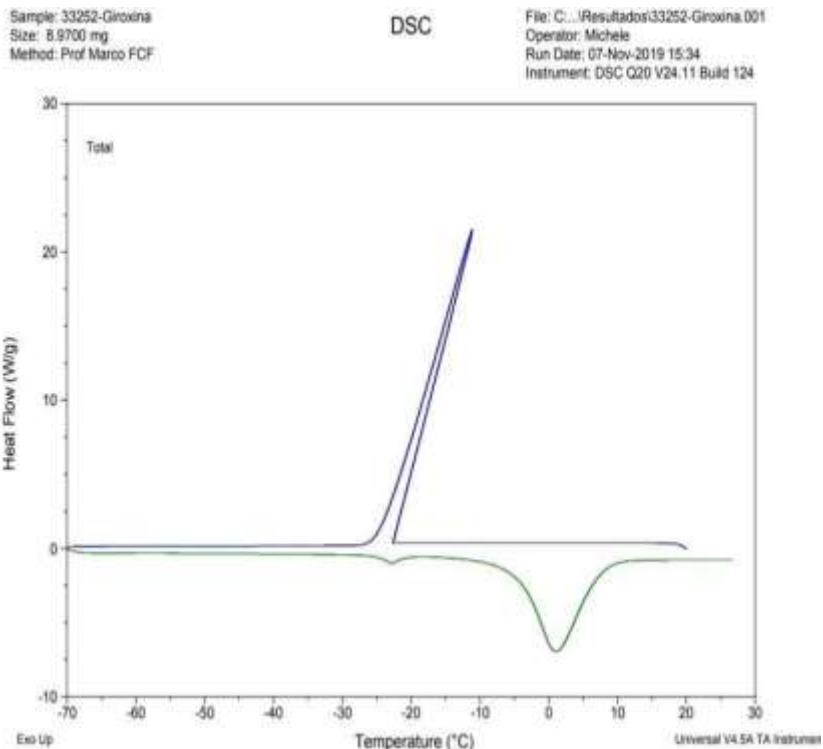
As temperaturas encontradas sugerem que a temperatura eutética seria encontrada no início do resfriamento onde a temperatura foi baixando até -22,71 °C, a água começou a cristalizar, tem aparência sólida, mas ainda está no estado líquido com aumento da viscosidade,

impedindo a cristalização, e assim o processo precisou liberar calor (283.0J/g CALOR), chegando assim à -11,18 °C que seria supostamente a temperatura do Ponto Eutético, com aparência sólida em todo o produto (Figura 16).



**Figura 16** - Ponto Eutético sugerido da Giroxina.

Na figura 17, foi possível se verificar as duas curvas, de resfriamento e do aquecimento da giroxina. Podemos visualizar na mesma figura o ponto de fusão a 1 °C .



**Figura 17** - Resfriamento/Aquecimento da gioxina.

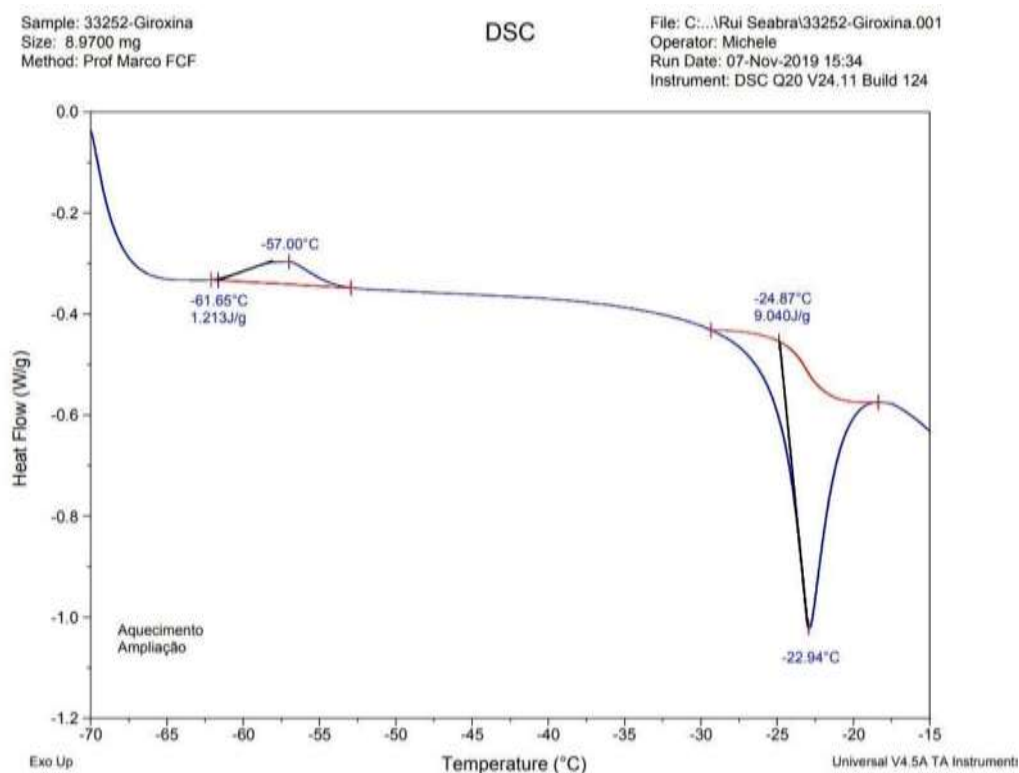
## FASE RESFRIAMENTO DA GIROXINA

Após a amostra chegar ao resfriamento de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , iniciou-se o aquecimento com temperatura final de  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nessa amostra obtivemos o registro de dois possíveis pontos de transição vítrea ou duas possíveis temperaturas distintas de transição vítrea e ponto de fusão.

### A) Transição vítrea da Gioxina

Neste experimento pudemos verificar a diferença que existe entre as duas amostras, gioxina e crioprecipitado, pois foram registradas na gioxina duas temperaturas diferentes de transição vítrea, a primeira transição vítrea registrada foi  $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a segunda a  $-22.94\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As temperaturas registradas na primeira transição vítrea foram de  $-61.65^{\circ}\text{C}$ , e precisou de  $1,213\text{ J/g}$  de calor para chegar até  $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a segunda foi  $-24,87\text{ }^{\circ}\text{C}$  e precisou de  $9.040\text{ J/g}$  calor para chegar até  $-22,94\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O fato de termos registrado dois pontos de transição vítrea sugere que a amostra giroxina precisa de estabilizantes para conseguir realizar uma liofilização de maneira adequada. Isto ter sido causado pelo baixo pH (3,0) em que a amostra se encontra. Neste caso, está indicado a utilização de estabilizantes para otimizar o processo de liofilização da giroxina devido o registro de dois pontos de transição vítrea. Na figura 18, pudemos observar que o DSC encontrou duas temperaturas distintas de transição vítrea para a giroxina.



**Figura 18.** Registro de 2 pontos de transição vítrea da giroxina.

## **B) Ponto de fusão da Giroxina**

O ponto de fusão foi encontrado a 1 °C onde o produto estava todo no estado líquido, iniciou a -4,47°C, após perder calor de 289,9 j/g, chegamos a temperatura de fusão de 1°C.

A figura 19 mostra o ponto inicial de fusão a -4,47°C e a

temperatura final de fusão a 1°C, assim como os dois pontos de transição vítrea, -57,00°C e -22,91°C.

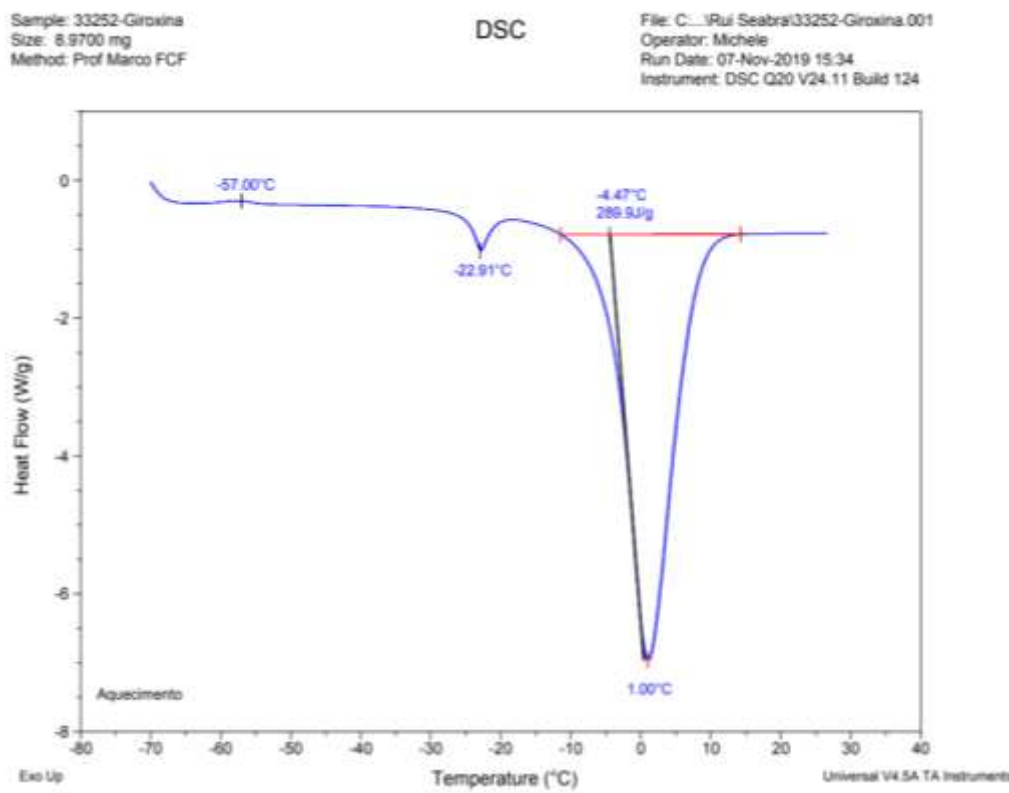


Figura 19 - Ponto de fusão da gioxina.

Alguns autores verificaram que em testes feitos com albumina bovina (100mg/ml) em tampão fosfato (ph= 7,3), a temperatura de transição vítrea registrada foi de -25°C, sendo que a -15°C observou-se uma possível cristalização dos sais de tampão e a 8°C chegou ao ponto de fusão da composição. Deve-se salientar o fato de que este experimento utilizou tampões e estabilizadores, enquanto utilizamos a amostra de crioprecipitado em estado puro, sem uso de tampões e crioprotetores<sup>40</sup>. Mesmo assim, foi possível já obter um bom resultado na liofilização do crioprecipitado, porém o mesmo não ocorreu com a gioxina que se mostrou instável e colapsou. A gioxina mostra, portanto, a necessidade de utilização de tampões e estabilizadores para possibilitar a sua liofilização.

Em estudos anteriores com presunto e lombo inteiros (diâmetro de 20mm) liofilizados mostraram temperatura de colapso ( $T_c$ ) de  $-31,9^\circ\text{C}$  para o presunto e de  $-30,8^\circ\text{C}$  para o lombo, assim, a temperatura de  $-35^\circ\text{C}$  a estrutura das amostras se mantiveram intactas, sem colapso. Os pontos de fusão do presunto e do lombo foram de  $-38^\circ\text{C}$  e  $-37^\circ$  respectivamente. A temperatura de pré-congelamento foi a  $-52^\circ\text{C}$ . Assim, definiu-se o ponto eutético de ambos foi  $-42^\circ\text{C}$  e devem ser liofilizados, portanto, de 10 a  $20^\circ\text{C}$  abaixo da temperatura de transição vítrea<sup>27</sup>.

Assim, para cada material liofilizado existe um mapa de liofilização próprio, não havendo, portanto, uma fórmula comum.

As características desejadas quando se trata de um produto final liofilizado é que a pastilha ou *cake* liofilizado esteja intacto e elegante, com uma cor uniforme e suficientemente seco, poroso, estéril e quimicamente estável, podendo ser armazenado e transportado de forma segura a temperatura ambiente, mas ainda sim mantendo todas as principais ações biológicas para ser ressuscitado rapidamente<sup>8</sup>.

É sabido que liofilização um método de secagem de formulações biofarmacêutica muito apreciada pelos pesquisadores e principalmente pela indústria para aumentar a estabilidade da proteína. Esse processo geralmente é feito abaixo da temperatura de transição vítrea de soluções concentradas com congelamento máximo ( $T_g'$ ), para evitar a agregação de proteínas, preservar a atividade das proteínas e obter bolos ou pastilhas “elegantes”. Mas ainda é um processo difícil e caro. Já existem estudos que mostram uma secagem primária acima de  $T_g'$  ou mesmo acima da temperatura de colapso ( $T_c$ ), e ainda assim não prejudicar a amostra, sendo uma opção interessante para se estudar a fundo, pois otimizaria o ciclo<sup>10</sup>.

Desta forma, focar somente no processo de liofilização e nas etapas de secagem, ou seja, na etapa de aquecimento é um fundamento ultrapassado, uma vez que a etapa de congelamento afeta o

desempenho do processo, assim como a qualidade e estabilidade do produto final liofilizado<sup>21</sup>.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho permitiu identificar as temperaturas envolvidas no processo de liofilização do crioprecipitado obtido do sangue de búfalos e da gioxina purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* componentes do Selante de Fibrina heterólogo. Desta maneira foi possível determinar as temperaturas para cada produto, como a temperatura de transição vítrea, temperatura de colapso e temperatura de fusão e sugere ponto eutético mesmo sendo um produto *in natura*, além disso, visualmente podemos ver e analisar essas temperaturas através de capturas de fotos, incluindo o colapso.

Por meio dos equipamentos DSC e FDM, conseguimos registrar as temperaturas de cada amostra. No caso da gioxina está indicada a adição de algum crio-conservante para auxiliar e otimizar o processo de liofilização.

A transição vítrea do crioprecipitado pelo DSC, foi de  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  para a amostra 1 e  $-29,27\text{ }^{\circ}\text{C}$  para a amostra 2. Assim, devido à proximidade dos dois resultados podemos validar estas temperaturas. Por meio do FDM a transição vítrea do crioprecipitado foi de  $-36,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  para a amostra 1 e  $-23,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  para a amostra 2. A primeira transição vítrea registrada para gioxina foi de  $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a segunda de  $-22,94\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Não foi possível encontrar a temperatura para secagem primária da gioxina.

O ponto de fusão, encontrado para crioprecipitado no primeiro teste (amostra1) foi a  $0,82^{\circ}\text{C}$ , onde todo o produto se encontra no estado líquido. O ponto de fusão registrado para gioxina foi a  $1^{\circ}\text{C}$ .

Devido ao fato de termos identificado duas temperaturas de transição vítrea para a gioxina, percebemos a necessidade do uso de

tampões e estabilizantes para otimizar a técnica sem prejuízos aos efeitos biológicos da amostra. Já o crioprecipitado notamos uma certa estabilidade mesmo sem uso de crioprotetores. Porém, a pastilha formada no produto final liofilizado mostrou aspecto encolhido e partido, assim, para obtermos um produto liofilizado com um pó elegante e de fácil redissolução, estaria também indicado o uso de crioprotetores, pois todo produto liofilizado é composto por agente de *bulking*, material amorfo, tampão, ajuste de tonicidade, entre outros componentes.

A liofilização dos componentes do selante heterólogo de fibrina é uma tecnologia que tornará possível a sua manutenção em temperatura ambiente, favorecendo assim o aumento do tempo de prateleira, a diminuição dos custos já que não necessitará da cadeia de frio para seu transporte e acondicionamento, ajudando assim no escalonamento de sua produção e disponibilização ao consumidor final.

Tisseel® é um selante de fibrina homólogo produzido pela Baxter Hospitalar LTDA que além da apresentação líquida que deve ser mantida congelada (-18 a -22°C), possui também a apresentação liofilizada de seus componentes (Tisseel Lyo®). Está indicado como selante em um complemento para técnicas cirúrgicas padrão (como sutura e ligadura) para evitar vazamento de anastomoses colônicas após a reversão de colostomias temporárias. Também está indicado para uso como adjuvante da hemostasia em pacientes adultos e pediátricos (> 1 mês de idade) submetidos à cirurgia quando o controle do sangramento por técnicas cirúrgicas convencionais (como sutura, ligadura e cautério) é ineficaz ou impraticável<sup>7</sup>.

Além das indicações anteriormente citadas de um selante de fibrina comercial, o selante heterólogo de fibrina tem sido amplamente estudado como *scaffold* para células tronco<sup>12</sup> e associado com terapias regenerativas complementares como a Fotobiomodulação<sup>13</sup> e adição de agentes antimicrobianos<sup>44</sup>, tendo obtido resultados promissores na regeneração de tecido ósseo<sup>14,36</sup> e nervoso<sup>22,31,35</sup>.

Recentemente, o selante heterólogo de fibrina foi avaliado e aprovado em um estudo clínico de fase I/II que avaliou a segurança de seu uso em úlceras venosas crônicas em 40 pacientes<sup>2</sup>. Os excelentes resultados auxiliaram a equipe do CEVAP no ajuste das doses utilizadas, bem como seus desfechos preliminares de eficácia encorajaram a equipe a iniciar as ações para a realização do estudo clínico de fase III para sua comprovação e posterior registro do biomedicamento na ANVISA.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Abbade, Luciana P. F. ; Barraviera, Silvia Regina Catharino Sartori ; Silvaes, Maria Regina Cavariani ; Lima, Ana Beatriz B. De C. O. ; Haddad, Gabriela R. ; Gatti, Márcia A. N. ; Medolago, Natália Bronzatto ; Rigotto Carneiro, Márcia Tonin ; Dos Santos, Lucilene Delazari ; Ferreira, Rui Seabra ; Barraviera, Benedito . Treatment of Chronic Venous Ulcers with Heterologous Fibrin Sealant: A Phase I/II Clinical Trial. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 1- 1, 2021. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.627541>.
2. Abbade LPF, Ferreira RS Jr, Santos LD, Barraviera B. Úlceras venosas crônicas: uma revisão sobre o tratamento com selante de fibrina e avanços prognósticos usando estratégias proteômicas. *J Venom Anim Toxins Includ Trop Dis* [Internet]. 2020 [citado 4 Fev 2021];26:e20190101. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0101>.
3. Alcarde AR. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas pelo processo de liofilização [dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 1996.
4. Araújo RS. Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário [dissertação]. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto; 2009.
5. Barros LC, Ferreira RS Jr, Barraviera SR, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ, et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009;12(8):553-71.
6. Barros LC, Soares AM, Costa FL, Rodrigues VM, Fuly AL, Giglio JR, et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Venom Anim Toxins Includ Trop Dis*. 2011;17(1):23-33.
7. Baxter Healthcare Corporation. TISSEEL [Fibrin Sealant]. Acessado em: 02/08/2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/71674/download>

8. Beech KE, Biddlecombe JG, van der Walle CF, Stevens LA, Rigby SP, Burley JC, et al. Insights into the influence of the cooling profile on the reconstitution times of amorphous lyophilized protein formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:247-54. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.07.029.
9. Bimeds. TA Instruments DSC Q20 Differential Scanning Calorimeter (601-0086) [Internet]. Kissimmee (FL): Bimedis LLC; 2021 [citado 5 Fev 2021]. Disponível em: <https://bimedis.com/a-item/laboratory-colorimetersta-instruments-dsc-q20-differential-scanning-calorimete-1467774>.
10. Bjelošević M, Seljak KB, Trstenjak U, Logar M, Brus B, Ahlin Grabnar P. Aggressive conditions during primary drying as a contemporary approach to optimise freeze-drying cycles of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Sci.* 2018;122:292-302. doi: 10.1016/j.ejps.2018.07.016.
11. Haseley, P; Oetjen, GW.. 3rd ed. Wiley-Vch, 2018.
12. Creste CFZ, Orsi PR, Landim-Alvarenga FC, Justulin LA, Golim MA, Barraviera B, et al. Highly effective fibrin biopolymer scaffold for stem cells upgrading bone regeneration. *Materials (Basel).* 2020;13(12):2747. doi: 10.3390/ma13122747.
13. Della Coletta, Bruna Botteon ; Jacob, Thiago Borges ; Moreira, Luana Aparecida De Carvalho ; Pomini, Karina Torres ; Buchaim, Daniela Vieira ; Eleutério, Rachel Gomes ; Pereira, Eliana De Souza Bastos Mazuqueli ; Roque, Domingos Donizeti ; Rosso, Marcelie Priscila De Oliveira ; Shindo, João Vitor Tadashi Cosin ; Duarte, Marco Antônio Húngaro ; Alcalde, Murilo Piori ; Júnior, Rui Seabra Ferreira ; Barraviera, Benedito ; Dias, Jefferson Aparecido ; Andreo, Jesus Carlos ; Buchaim, Rogério Leone . Photobiomodulation Therapy on the Guided Bone Regeneration Process in Defects Filled by Biphasic Calcium Phosphate Associated with Fibrin Biopolymer. *Molecules*, v. 26, p. 847, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26040847>.
14. De Oliveira CTB; Leonel BC; De Oliveira AC; De Brito Paiva M; Ramos J; Barraviera B; Ferreira Junior RS; Shimano AC. Effects of fibrin sealant and bone fragments on defect regeneration performed on rat tibiae: An experimental study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical*

Materials, v. 104, p. 103662, 2020.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103662>.

15. Ereno D. Veneno que cola, enzima substitui sutura tradicional sem deixar cicatrizes. *Pesqui Fapesp* [Internet]. 2009 [citado 5 Fev 2021];158. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2009/04/01/veneno-que-cola>.
16. Ferreira RS Jr, Barros LC, Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silves MRC, Pontes LG, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside – an overview. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* [Internet]. 2017 [citado 4 Fev 2021];23:21. Disponível em: <https://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40409-017-0109-8>
17. Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga FC, Oliveira ALR, Simões GF, Lima Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2014 [citado 5 Fev 2021];5:78. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/112229>
18. GEA Engineering for a Better World. Princípios básicos da liofilização farmacêutica [Internet]. Düsseldorf: GEA; 2020 [citado 4 Fev 2021]. Disponível em: <https://www.gea.com/pt/stories/freeze-drying-fundamentals.jsp>
19. Giuberti CS. Otimização do processo de produção piloto e desenvolvimento de um programa de liofilização de lipossomas PH- sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
20. Hajare A, More N, Walekar P, Hajare D. Optimization of freeze drying cycle protocol using real time microscopy and integrated differential thermal analysis-electrical impedance. *Res J Pharmacy Technol*. 2012;5(7):985-91. doi: 10.5958/0974-360X.
21. Kasper JC, Fries W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(2):248-63.
22. Kempe PRG, Chiarotto GB, Barraviera B, Ferreira Jr. RS, Oliveira ALR. Neuroprotection and immunomodulation by dimethyl fumarate and a

- heterologous fibrin biopolymer after ventral root avulsion and reimplantation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 26, e20190093. 2020. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0093>
23. Koroishi ET. Estudo do processo de liofilização: aplicação para suco de laranja [dissertação]. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
  24. Lale SV, Goyal M, Bansal AK. Development of lyophilization cycle and effect of excipients on the stability of catalase during lyophilization. *Int J Pharm Investig*. 2011;1(4):214-21. doi: 10.4103/2230-973X.93007.
  25. Li M, Koranne S, Fang R, Lu X, Williams DM, Munson EJ, et al. Probing Microenvironmental Acidity in Lyophilized Protein and Vaccine Formulations Using Solid-state NMR Spectroscopy. *J Pharm Sci*. 2021 Mar;110(3):1292-1301. doi: 10.1016/j.xphs.2020.11.017.
  26. Marques LG. Liofilização de frutas tropicais [tese]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2008.
  27. Ma Y, Wu X, Zhanga Q, Giovanni V, Meng X. Composition optimization of meat processed protein source by vacuum freeze-drying technology. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(4):724-32. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.09.013.
  28. Nascimento S. Biocurativo de sangue de búfalo e veneno de cascavel ajuda no tratamento e úlceras. *Rev Globo Rural* [Internet]. 20 Maio 2016 [citado 4 Fev 2021]. Disponível em: <https://revistagloborural.globo.com/Noticias/PesquisaeTecnologia/noticia/2016/05/biocurativo-de-sangue-de-bufalo-e-veneno-de-cascavel-ajuda-no-tratamento-de-ulceras.html>
  29. Patel SM, Doen T, Pikal MJ. Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(1):73- 84. doi: 10.1208/s12249-009-9362-7.
  30. Perrone IT, Silveira ACP, Martins E, Carvalho AF, Schuck P. Soro em pó: estado vítreo e condições de operação do spray dryer. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2016;71(2):106-18. doi: 10.14295/2238-6416.v70i2.527.

31. Pinto, Carina Guidi ; Leite, Ana Paula Silveira ; Sartori, Arthur Alves ; Tibúrcio, Felipe Cantore ; Barraviera, Benedito ; Junior, Rui Seabra Ferreira ; Filadelpho, André Luis ; De Carvalho, Samara Camaçari ; Matheus, Selma Maria Michelin . Heterologous fibrin biopolymer associated to a single suture stitch enables the return of neuromuscular junction to its mature pattern after peripheral nerve injury. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, v. 52, p. 731-737, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2020.10.070>.
32. Rey L, May JC. freeze drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. 3rd ed. New York: informa healthcare; 2010.
33. Ribeiro PFFAC. Processo de liofilização de produtos alimentares perecíveis [dissertação]. Lisboa: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa; 2012.
34. Rodrigues I. Liofilização [Internet]. Coimbra: Escola Superior Agrária de Coimbra; 2008 [citado 5 Fev 2021].  
Disponível em:  
<http://www.esac.pt/noronha/pgs/0708/Aula%20Liofiliza%C3%A7%C3%A3o.pdf>.
35. Rodríguez-Sánchez, Diego Noé; Pinto, Giovana Boff Araujo; Cartarozzi, Luciana Politti ; De Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues; Bovolato, Ana Livia Carvalho ; De Carvalho, Marcio ; Da Silva, Jorge Vicente Lopes ; Dernowsek, Janaina De Andréa ; Golim, Marjorie ; Barraviera, Benedito; Ferreira, Rui Seabra ; Deffune, Elenice ; Bertanha, Mathues; Amorim, Rogério Martins . 3D-printed nerve guidance conduits multi-functionalized with canine multipotent mesenchymal stromal cells promote neuroregeneration after sciatic nerve injury in rats. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 12, p. 1, 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-021-02315-8>.
36. Rosso MPO; Oyadomari AT; Pomini KT; Della Coletta BB; Shindo JVTC; Ferreira Júnior RS; Barraviera B; Cassaro CV; Buchaim DV; Teixeira DB; Barbalho SM; Alcalde MP; Duarte MAH; Andreo JC; Buchaim RL. Photobiomodulation Therapy Associated with Heterologous Fibrin Biopolymer and Bovine Bone Matrix Helps to Reconstruct Long Bones. *Biomolecules*, v. 10, p. 383, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10030383>.

37. Selectscience. Lyostat freeze drying microscope by Biopharma Process Systems [Internet]. Bath (UK): Selectscience; 2021 [citado 4 Ago 2021]. Disponível em: <https://www.selectscience.net/products/lyostat-freeze-drying-microscope/?prodID=171620#tab-2>
38. Shon M. Otimização do ciclo de liofilização primária [Internet]. São Paulo: Lobov Científica; s. d. [citado 5 Fev 2021]. Disponível em: [https://lobov.cos\\_pdf/Otimizacao\\_do\\_ciclo\\_de\\_Liofilizacao\\_Primaria.pdf](https://lobov.cos_pdf/Otimizacao_do_ciclo_de_Liofilizacao_Primaria.pdf)
39. Tattini V Jr, Parra DF, Pitombo RNM. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. Rev Bras Ciênc Farm. 2006;42(1):127- 36.
40. Tattini V Jr. Efeito da liofilização sobre a estrutura e mudanças de fase da albumina bovina modificada por reação com metoxi-polietilenoglicol [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2004.
41. Tattini V Jr. Etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2008.
42. Terroni HC, Jesus JM, Artuzo LT, Ventura LV, Santos RF, Damy- Benedetti PC. Liofilização. Rev Cient Unilago [Internet]. 2013 [citado 4 Fev 2021]:271-84. Disponível em: <http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/LIOFILIZA%C3%87%C3%83O.pdf>
43. UNESP. Assessoria de Comunicação e Imprensa. Notícias. Anvisa aprova ensaios clínicos do selante de fibrina da Unesp [Internet]. São Paulo: Unesp; 2015 [citado 5 Fev 2021]. Disponível em: <https://www2.unesp.br/portal#!/noticia/18132/anvisa-aprova-ensaios-clinicos-do-selante-de-fibrina-da-unesp>.
44. Venante, Helena Sandrini; Chappuis-Chocano, Ana Paula ; Marcillo-Toala, Oscar Oswaldo ; Da Silva, Rafaela Alves ; Da Costa, Rodrigo Moreira Bringel ; Pordeus, Mariana Domingues ; Barraviera, Benedito ; Ferreira Junior, Rui Seabra ; Lara, Vanessa Soares ; Neppelenbroek, Karin Hermana ; Honório, Heitor Marques ; Porto, Vinicius Carvalho . Fibrin Biopolymer Incorporated

with Antimicrobial Agents: A Proposal for Coating Denture Bases. *Materials*, v. 14, p. 1618, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/ma14071618>.

45. Yamaguchi SKF, Krebs CS, Bertolli SL, Carvalho LF. Liofilização de produtos lácteos: uma revisão. *Rev Espacios*. 2017;38(22):1-11.


# ANEXO 1

## CERTIFICADO Nº 04/2019 - CEUA

Certificamos que o projeto intitulado "**LIOFILIZAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA HETERÓLOGO**", vinculado ao Protocolo nº 04/2019, sob a orientação do Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior e colaboração de Juliana de Barros Mennocchi, para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biotecnologia da UNESP na reunião de 14 de fevereiro de 2019.

Finalidade:                     Ensino                     Pesquisa Científica  
Vigência do Projeto:        Início: 01/03/2019        Término: 01/03/2021

Botucatu, 28 de abril de 2020.

  
Prof. Dr. Sílvio Luis de Oliveira  
Coordenador da CEUA