

Estudo do comportamento higroscópico do pericárdio bovino liofilizado

Ana Maria I. B. Ayrosa¹, Marina J. S. Maizato², Bronislaw Polakiewicz¹,
Marisa M. Beppu³, Olga Z. Higa⁴, Ronaldo N. M. Pitombo¹

¹ Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, FCF - Universidade de São Paulo,
CP 66083, Cidade Universitária, São Paulo, SP. CEP: 05315-970.

e-mail: anayrosa@uol.com.br, bronipol@usp.br, pitombo@usp.br

² Divisão de Bioengenharia, InCor, H.FMUSP, São Paulo, SP.

e-mail: biomarina@incor.usp.br

³ Departamento de Termofluidodinâmica, UNICAMP, Campinas, SP.

e-mail: beppu@feq.unicamp.br

⁴ IPEN/CNEN, São Paulo, SP.

e-mail: ozahiga@pesquisador.cnpq.br

RESUMO

O comportamento higroscópico de produtos desidratados pode ser visualizado a partir da construção de curvas denominadas Isotermas de Sorção de Umidade (ISU). Esse tipo de curva relaciona a quantidade máxima de água absorvida por uma substância, com a pressão de vapor de equilíbrio ou a atividade de água, numa dada temperatura mantida constante. Com o objetivo de estudar posteriormente a reconstituição, material de embalagem e utilização de implantes feitos a partir de pericárdio bovino liofilizado, foram traçadas curvas de adsorção e desorção de umidade em um analisador de sorção de vapor de água, Hydrosorb™ 1000, nas temperaturas de 15, 25 e 35°C. Os resultados obtidos mostraram ISU tendendo ao tipo II, segundo a classificação de BET, reação típica de superfícies hidrofílicas com formação de monocamada e multicamadas. O fenômeno da histerese foi observado durante todo o intervalo da ISU. Os modelos matemáticos de Brunauer-Emmett-Teller (BET) e Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) ajustaram bem os dados experimentais permitindo o cálculo do valor monomolecular, importante para a estimativa do nível crítico de umidade residual que confere maior estabilidade de armazenamento ao produto.

Palavras chaves: Liofilização, pericárdio bovino, comportamento higroscópico, isotermas de sorção de umidade.

Hygroscopic behavior of lyophilized bovine pericardium

ABSTRACT

Hygroscopic behavior of lyophilized products can be visualized starting from the construction of Moisture Sorption Isotherms (MSI). Such curves show the relationship between the maximum amount of absorbed water for a substance, with the equilibrium vapor pressure or water activity, at a given constant temperature. Aimed to study later the reconstitution and use of biological materials of lyophilized bovine pericardium, it was plot adsorption and desorption curves, at temperatures of 15, 25 and 35°C, on Hydrosorb™ 1000 – water vapor sorption analyzer. The results showed MSI type II, according BET classification, typical reaction of hydrophilic surfaces with monolayer and multilayer formation. Histerese phenomenon was observed during the whole MSI interval. The mathematical models of BET and GAB fitted well the experimental data and allowed the water monolayer calculation, estimate the critical level of residual moisture that assures more stability to the product.

Keywords: Lyophilization, freeze-drying, bovine pericardium, hygroscopic behavior, moisture sorption isotherms.

1 INTRODUÇÃO

O Pericárdio Bovino (PB), membrana que envolve o coração bovino, é um tecido biológico amplamente estudado na literatura para a produção de produtos de uso médico, vários já em uso clínico. A

estrutura de tecidos biológicos, tipo PB, é basicamente constituída de colágeno e são usados na medicina, após serem tratados física e/ou quimicamente no sentido de melhorar as suas propriedades mecânicas e imunogênicas, de controle da sua degradação ou calcificação. Como exemplos da sua utilização podemos citar: confecção de próteses cardíacas e vasculares, reparação de ligamentos, sistemas de liberação controlada de drogas, agentes hemostáticos, enxertos, etc. As próteses valvares confeccionadas com PB possuem um bom desempenho hidrodinâmico e baixa trombogenicidade. [9].

MAIZATO (2003) [9], estudou as alterações provocadas pelo processo de liofilização nas características do PB com a finalidade de demonstrar que é possível reconstituí-lo e empregá-lo da mesma forma que o não liofilizado. Concluiu que o PB pode ser liofilizado antes ou após o tratamento com glutaraldeído/formaldeído sem sofrer alterações nas propriedades mecânicas e na temperatura de retração ou encolhimento (“shrinkage”) além de promover um decréscimo da citotoxicidade e no teor de aldeídos residuais.

Diversos autores têm aplicado a técnica de liofilização em biomateriais com a finalidade de substituir ou restaurar órgãos e/ou tecidos danificados favorecendo a compatibilidade desses materiais com o ambiente fisiológico. [8, 11, 13].

O comportamento higroscópico de produtos desidratados pode ser estudado a partir da construção de curvas denominadas Isotermas de Sorção de Umidade (ISU). Essas curvas relacionam a quantidade máxima de água absorvida por uma substância, com a pressão de vapor de equilíbrio ou a atividade de água, numa dada temperatura mantida constante. As ISU propiciam um meio rápido e seguro para prever a estabilidade física, química e microbiológica do produto com baixo conteúdo de umidade, e de seu formato podem ser retiradas informações de grande interesse para o estudo dessa estabilidade, do processo de desidratação e posterior reidratação, além de subsídios para a escolha do material de embalagem adequado. [1].

A quantidade de água adsorvida é uma função da afinidade entre a superfície e as moléculas de água, temperatura, concentração do vapor de água (pressão, seja expressa como pressão parcial, pressão relativa, umidade relativa ou atividade de água) e, evidentemente, a área de superfície exposta. Além das moléculas que são adsorvidas diretamente sobre a superfície do sólido, moléculas adicionais podem condensar em poros dependendo do seu tamanho.

A afinidade entre a água e a superfície não depende só de forças de dispersão fracas, mas também de forças eletrostáticas e mais especificamente de forças associadas com a formação de pontes de hidrogênio. A força das pontes de hidrogênio depende da natureza química da superfície, especialmente a presença de oxigênio. Grupos hidroxilas também exercem um papel importante, dependendo da temperatura de tratamento. Além disso, alguns materiais poderiam sofrer reação química adsorvendo umidade de superfície para formar hidróxidos ou hidratos. Penetração da água adsorvida pode ocorrer no caso da ISU apresentar comportamento de absorção e pode ser acompanhada por aumento de volume ou rearranjo significativo dos cristais de gelo.

Sorção física é um processo dinâmico, onde moléculas de água são constantemente adsorvidas e dessorvidas. Diz-se que o sistema está em equilíbrio quando a taxa de chegada de moléculas na adsorção se iguala à taxa de saída de moléculas na dessorção. Para estes casos que envolvem forças predominantemente fracas, o aumento da temperatura diminuirá o equilíbrio da quantidade de água na superfície e diminuindo a temperatura deve-se aumentar a quantidade de água adsorvida em virtude da diminuição da energia cinética do sistema. A reidratação requer reação química com a água, e pode exigir energia térmica suficiente para superar a barreira de ativação. Assim, neste caso, aumentando-se a temperatura haverá um aumento na captação de água. [12]

A concentração de moléculas de água na fase gasosa sobre a superfície sólida influencia significativamente a quantidade de água adsorvida. A literatura cita inúmeros modelos matemáticos para descrever o comportamento higroscópico de produtos desidratados. [7]

Neste trabalho estudou-se o comportamento higroscópico de PB, tratado com glutaraldeído, com o objetivo de estabelecer a termodinâmica de sorção de água e verificar a aplicabilidade de modelos matemáticos (Tabela 1): 1) de Brunauer-Emmett-Teller (BET), modelo cinético baseado na formação de camada monomolecular pelo processo de adsorção de vapor de água pela superfície do sólido seco a baixas pressões de vapor; 2) de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), é considerado mais eficiente por aplicar-se em todo o intervalo da ISU. [4, 10]; e 3) a equação de Clausius-Clapeyron aplicado no cálculo do calor de adsorção do material estudado. [3]

Tabela 1: Modelos matemáticos aplicados as ISU de PB liofilizado.

Modelo matemático	Equação
BET	$\frac{A_w}{W(1-A_w)} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{W_m C} A_w$
GAB	$\frac{W}{W_m} = \frac{C k A_w}{(1 - k A_w)(1 - k A_w + C k A_w)}$
Clausius-Clapeyron	$\ln A_w = \frac{-\Delta H_w}{RT}$

A_w = atividade de água ou umidade relativa; C e k = constantes; W = conteúdo de umidade (% base seca);
 W_m = conteúdo de umidade na monocamada (% base seca); ΔH_w = Calor de sorção da água (kcal/mol);
 R = constante dos gases (1,987 cal/kmol); T = Temperatura (K)

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Produto de Pericárdio Bovino (PB) fornecido pelo InCor, produzido com pericárdio proveniente de matadouro e submetido a reticulação do colágeno por tratamento com glutaraldeído, seguindo padronização já convencional para utilização em próteses valvares. [9].

2.2 Liofilização das Amostras

As amostras de PB após sucessivas lavagens em soro fisiológico foram congeladas em freezer a -70°C e liofilizadas à temperatura ambiente por 24 horas em um liofilizador FTS Systems, modelo TDS 00209-A. Após a liofilização as amostras foram embaladas hermeticamente e armazenadas em freezer a -18°C .

2.3 Construção das Isotermas de Sorção de Umidade

Em um analisador de Sorção de Vapor de Água, HydrosorbTM 1000, Quantachrome Instruments, FL, USA, foram construídas curvas de adsorção e dessorção do PB liofilizado às temperaturas de 15, 25 e 35°C . Amostras de aproximadamente 30 mg de PB liofilizado, depois de pesadas em balança analítica, seguindo um procedimento padrão, foram colocadas no porta-amostra do equipamento, devidamente calibrado para cada temperatura estudada. O porta amostra foi então acoplado ao equipamento, acionado o sistema de vácuo, e assim permaneceu por mais de 12 horas envolto em uma manta à temperatura de 60°C . Este procedimento tem por finalidade remover vestígios de água residual em virtude da manipulação da amostra. Após esse período, a amostra foi novamente pesada e a manta foi substituída por um banho às temperaturas de 15, 25 e 35°C com agitação. Sob vácuo, traçaram-se as ISU no Hydrosorb, condicionando as amostras a diferentes pressões de vapor, estabelecidas por 13 pontos de umidade relativa na adsorção e 9 pontos na dessorção. O procedimento foi repetido 3 vezes para o mesmo material e temperatura. A análise durou em média 9 horas para cada temperatura estudada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isotermas de Sorção de Umidade (ISU) a 15, 25 e 35°C

As Figuras 1, 2 e 3, apresentam as ISU do PB liofilizado nas temperaturas de 15, 25 e 35°C .

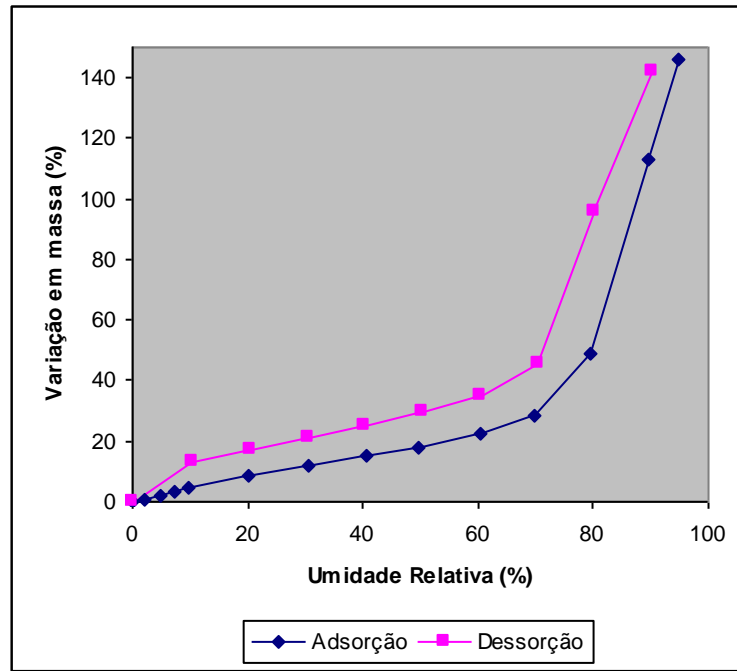


Figura 1: Isoterma de Sorção de Umidade a 15°C de Pericárdio Bovino Liofilizado.

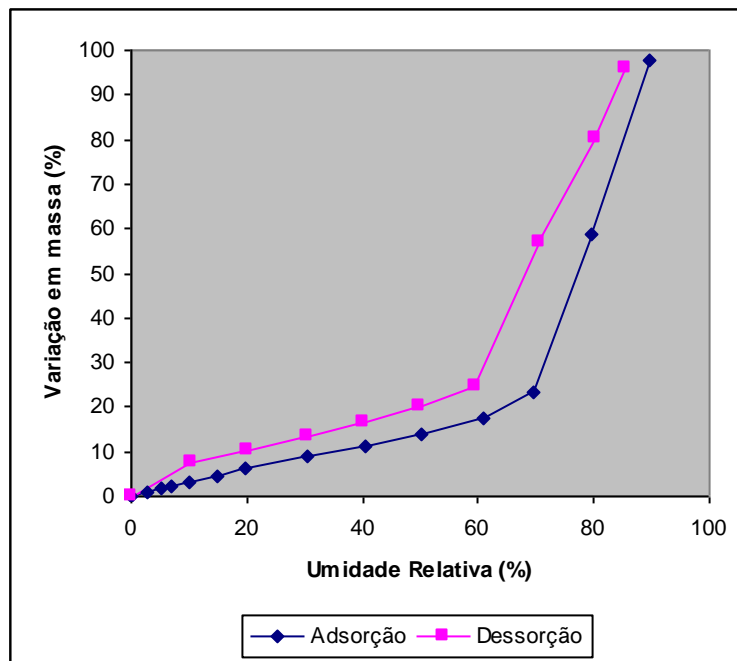


Figura 2: Isoterma de Sorção de Umidade a 25°C de Pericárdio Bovino Liofilizado.

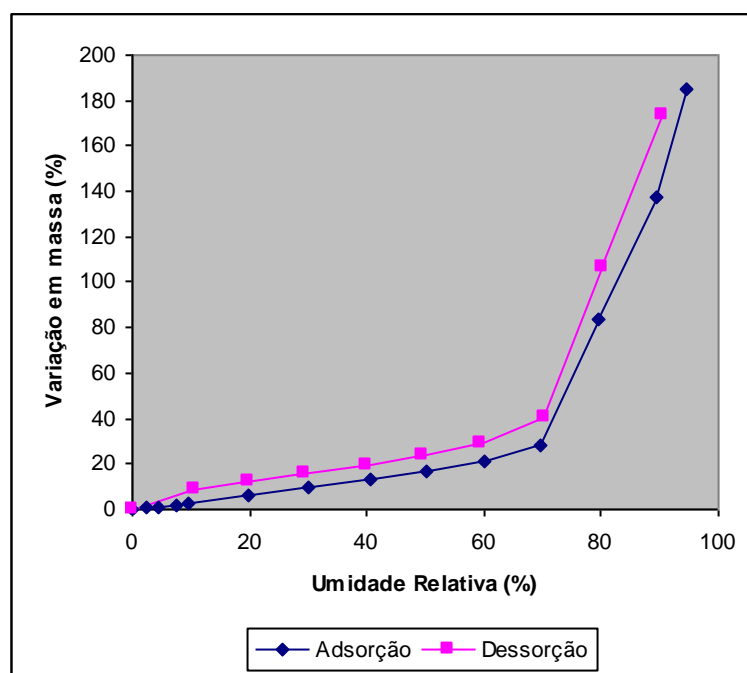


Figura 3: Isoterma de Sorção de Umidade a 35°C de Pericárdio Bovino Liofilizado.

Como pode ser observado, as ISU das figuras acima mostram que a curva de adsorção está abaixo da curva de dessorção em todo o intervalo de umidade relativa e nas três temperaturas consideradas, como se o equilíbrio tivesse sido alcançado a cada intervalo de umidade. Isto é devido ao fenômeno da histerese, que faz com que seja necessária uma menor pressão de vapor para se atingir um certo teor de umidade por um processo de dessorção que por adsorção [1]. Esse fenômeno parece diminuir com o aumento de temperatura, ou seja, a distância entre as duas curvas diminui à medida que a temperatura aumenta. Na prática, a isoterma de dessorção deve ser usada quando o intuito é estudar o processo de secagem e a isoterma de adsorção quando se deseja prever a vida-de-prateleira de um produto desidratado. Visualmente as curvas isotérmicas nas três temperaturas apresentam tendência à classificação das mesmas como isotermas tipo II segundo Brunauer-Emmett-Teller, e corroboram com o encontrado por AYROSA e PITOMBO (1996) [3], trabalhando com carne bovina cozida liofilizada.

3.2 Ajuste das ISU aos modelos matemáticos de BET e GAB

O conhecimento das ISU de um produto liofilizado propicia informações para o estabelecimento de relações termodinâmicas as quais permitem uma interpretação teórica dos resultados experimentais.

A equação de BET (Tabela 1) se assemelha à equação de uma reta e, para a maioria dos sólidos, restringe-se a uma região limitada da curva isotérmica de adsorção, normalmente no intervalo de 0,05 a 0,35 de umidade relativa (UR), intervalo este considerado no presente trabalho.

Para a resolução da equação de GAB (Tabela 1), a mesma foi reduzida a um polinômio de segundo e solucionada por regressão quadrática.

A Tabela 2 apresenta os resultados da aplicação dos dois modelos, com os respectivos parâmetros.

Pelos resultados obtidos, observando o valor da constante C , nota-se que para as curvas de adsorção, tanto no modelo BET como no GAB o valor fica abaixo de 10. De acordo com a literatura, neste caso, a isoterma geralmente tem características do tipo III, segundo a classificação de BET. ISU do tipo III é típica de adsorção de materiais hidrofóbicos não porosos. Isto contraria os resultados encontrados em literatura referentes a materiais protéicos como o colágeno do PB. Já nas curvas de dessorção para as três temperaturas e ambos os modelos o valor da constante C situou-se acima de 10, classificando a curva como tipo II, o que é visivelmente observado. A isoterma tipo II, típica de superfícies hidrofílicas, apresenta forma sigmóide e a formação de monocamada e multicamada de adsorção de vapor. Na prática, para esses tipos de isoterma, a forma é tal que os valores de umidade são pequenos, portanto de menor precisão. O cálculo do valor monomolecular através da equação de BET torna-se progressivamente impreciso à medida que o valor de C se aproxima da unidade. [10]

Tabela 2: Parâmetros dos modelos BET e GAB nas ISU de PB liofilizado.

Temperatura °C		BET			GAB			
		W _m	C	%E	W _m	C	k	%E
15	Adsorção	13,81	3,70	1,91	11,11	5,44	0,98	7,48
	Dessorção	15,64	28,43	0,43	15,78	28,40	0,97	8,75
25	Adsorção	10,80	3,21	1,52	8,25	4,91	1,02	7,99
	Dessorção	10,97	13,88	0,83	11,23	11,18	1,03	13,53
35	Adsorção	18,89	1,36	1,89	11,98	2,45	1,01	10,54
	Dessorção	13,25	12,24	0,70	13,11	12,11	1,02	13,45

%E = desvio médio relativo

Os valores encontrados do conteúdo de umidade na região da camada monomolecular, indicam que o produto, em baixas umidades relativas, não é excessivamente higroscópico. FULLERTON *et al.* (2005 a e b) [5, 6], trabalhando com colágeno de tendão bovino, por cristalografia, encontraram valores semelhantes aos nossos para o teor de umidade na camada monomolecular.

Verificou-se o ajuste de ambos os modelos, através do cálculo do desvio médio relativo %E. Os modelos são considerados satisfatórios quando %E for menor ou igual a 10%. [2, 10]

O modelo BET ajustou perfeitamente as curvas de adsorção e dessorção de umidade em todas as temperaturas estudadas. O modelo GAB apresentou valores de %E superiores a 10% nas curvas de dessorção a 25 e 35°C. Nestas duas curvas, verifica-se a ocorrência de uma mudança brusca na inflexão da curva a partir de 60% de UR a 25°C e 70% de UR a 35°C. Até esses pontos o ajuste é perfeito ao modelo. Isto pode ser indicativo de uma mudança morfológica no produto em umidades relativas mais altas.

3.3 Efeito da Temperatura sobre o Equilíbrio Higroscópico

A Figura 4 mostra o efeito da temperatura de condicionamento no conteúdo de umidade de equilíbrio para os diversos níveis de UR estudados. Como se pode observar, variações nas condições do ambiente têm certa influência no posicionamento da isoterma. Até 70% de UR, o comportamento das três curvas não apresenta modificações significativas. Teoricamente o aumento da temperatura teria o efeito de abaixar o posicionamento da isoterma indicando uma diminuição da quantidade de água adsorvida. A partir de 70% de UR verifica-se o cruzamento das curvas e a de 35°C inverte o comportamento aumentando a quantidade de água adsorvida até atingir o equilíbrio. O cruzamento e a possível divergência das ISU com o aumento da temperatura têm sido reportado por vários autores e pode estar relacionado com o efeito da dissolução dos sais presentes na amostra. A dissolução é favorecida pela alta temperatura em um processo endotérmico, compensando o efeito oposto sobre os constituintes de alto peso molecular. Em baixos valores de UR, a adsorção é devida principalmente aos biopolímeros como, por exemplo, as proteínas, amidos, polisacarídeos, e um aumento na temperatura tem o efeito normal de abaixar a isoterma em relação às abscissas. [3]

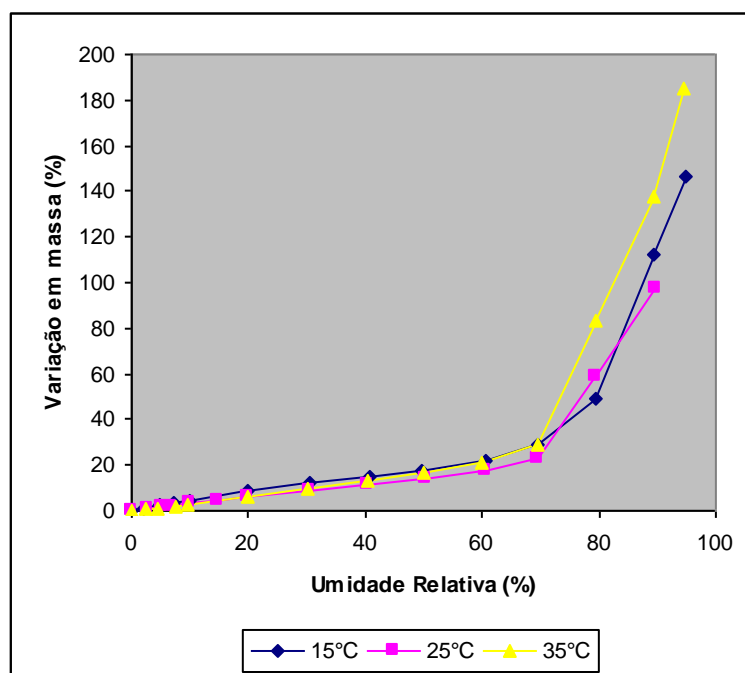


Figura 4. Isotermas de adsorção de umidade a 15, 25 e 35°C do PB liofilizado.

3.4 Cálculo do Calor Isostérico de Sorção de Água

Aos dados experimentais das ISU, aplicou-se a equação de Clausius-Clapeyron (Tabela 1), que é a função termodinâmica usada para expressar a dependência da temperatura pela pressão de vapor. Esta equação, além de permitir o conhecimento do valor da energia de ligação das moléculas de água ligadas aos sítios de adsorção, permite prever os valores de sorção a outras temperaturas.

Fixando-se níveis de umidade pela equação das ISU, obtêm-se os valores correspondentes de A_w para as três temperaturas estudadas. Traçam-se então as isósteres correspondentes, mostradas na Figura 5, as quais relacionam o efeito da temperatura absoluta sobre a A_w em diferentes níveis de umidade de equilíbrio, tomadas das ISU.

Pelas tangentes das isósteres, conforme a equação de Clausius-Clapeyron, encontram-se os valores do calor de adsorção, ΔH_w , que somado ao calor latente de vaporização da água (10,45 kcal/mol), fornece o calor total de adsorção, representado na Figura 6. Este parâmetro indica a energia de ligação entre as moléculas de vapor de água e a superfície adsorvente. Aproxima-se de zero quando o conteúdo de umidade é elevado e torna-se bastante alto em conteúdos de umidade próximos ao valor monomolecular. A comprovação prática deste fato está na grande dificuldade encontrada para remover os últimos vestígios de água durante a desidratação de alimentos, exigindo considerável fornecimento de energia. [3]

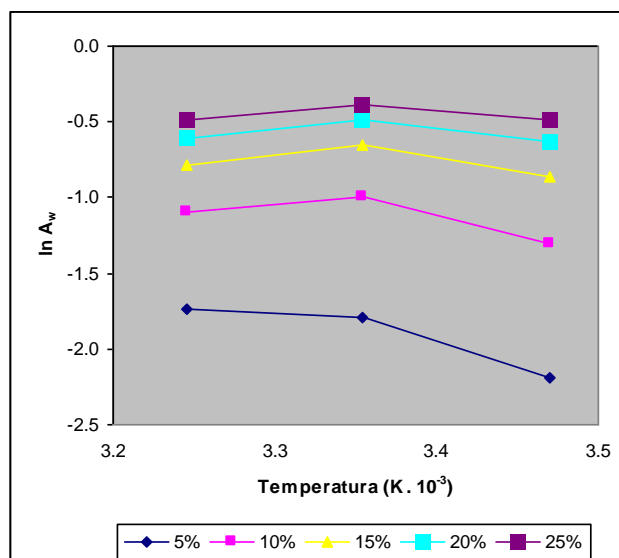


Figura 5. Isósteres do PB liofilizado.

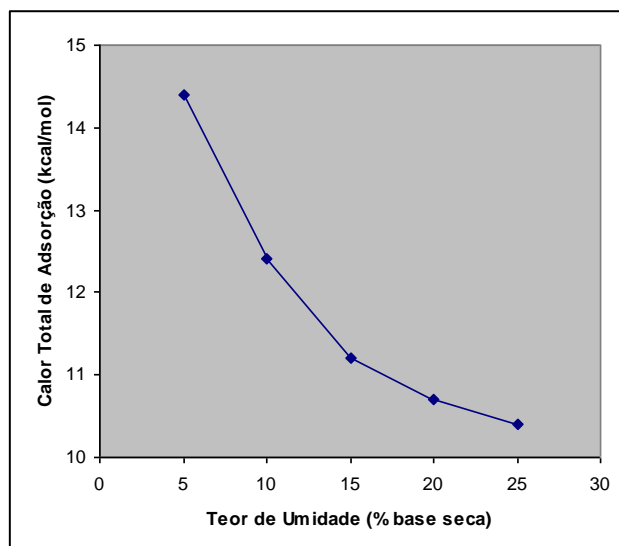


Figura 6. Calor total de adsorção em função do teor de umidade do PB liofilizado.

4 CONCLUSÕES

O modelo matemático de BET ajustou-se bem às ISU em todas as temperaturas estudadas. O modelo GAB apresentou valores do desvio médio relativo (%E) superiores a 10% para as curvas de dessorção a 25 e 35°C, as demais mostraram bom ajuste. Este fato pode estar relacionado a uma mudança morfológica ocorrida no produto em umidades relativas acima de 60%. Os valores monomoleculares encontrados por ambos os modelos indicam um produto pouco higroscópico, o que facilita a armazenagem e a conservação.

As ISU fornecem diretrizes metodológicas que podem contribuir para garantir a aplicação segura do PB liofilizado, boa estabilidade do produto desidratado e fácil reconstituição.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] AYROSA, A.M.I.B., “Atividade de Água e suas Aplicações nos Processos de Conservação, Secagem e Manipulação de Alimentos e Medicamentos”, *Revista de Engenharia FAAP*, v. 18, n.4 7, pp. 41-47, 2005.
- [2] AYROSA, A.M.I.B., “Estudo do Perfil de Textura da Carne Bovina Cozida Liofilizada”, *Tese de Doutorado*, FCF - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- [3] AYROSA, A.M.I.B., PITOMBO, R.N.M., “Comportamento Higroscópico da Carne Bovina Cozida Liofilizada”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 16, n. 1, pp. 12-17, 1996.
- [4] BIZOT, H., “Using the GAB model to Construct Sorption Isotherms”, in *Physical Properties of Foods*, Jowitt, R.; Escher, F.; Hallstrom, B.; *et al.* (eds.), Applied Science Publishers, London, 1983.
- [5] FULLERTON, G.D., AMURAO, M.R., “Evidence that Collagen and Tendon have Monolayer Water Coverage in the Native State”, *Cell Biology International*, v. 30, pp. 56-65, 2005.
- [6] FULLERTON, G.D., AMURAO, M.R., “An NMR Method to Characterize Multiple Water Compartments on Mammalian Collagen”, *Cell Biology International*, v. 30, pp. 66-73, 2005.
- [7] HINZ, C., “Description of Sorption Data with Isotherm Equations”, *Geoderma*, v. 99, pp. 225-243, 2001.
- [8] KUMAR, T.R.S., KRISHNAN, L.K., “A Stable Matrix for Generation of Tissue Engineered Nonthrombogenic Vascular Grafts”, *Tissue Engineering*, v. 8, n. 5, pp. 763-770, 2002.
- [9] MAIZATO, M.J.S., “Avaliação das Propriedades do Pericárdio Bovino Liofilizado”, *Tese de Doutorado*, UNICAMP, Campinas, 2003.
- [10] MEDEIROS, M.L., AYROSA, A.M.I.B., PITOMBO, R.N.M., *et al.*, “Sorption Isotherms of Cocoa and Cupuassu Products”, *Journal of Food Engineering*, v. 73, pp. 402-406, 2006.
- [11] PALMER, E.M., BAUM, L.G., VAN SEVENTER, G.A., “Small Intestinal Submucosa Induces Loss of Mitochondrial Integrity and Caspase Dependent Apoptosis in Human T Cells”, *Tissue Engineering*, v. 9, n. 2, pp. 307-314, 2003.
- [12] ROUQUEROL, J., ROUQUEROL, F., SING, K.S.W., *Adsorption by Powders & Porous Solids*, Academic Press, New York, 1999.
- [13] ZALESKE, D., PERETTI, G., ALLEMANN, F., *et al.*, “Engineering a Joint: a Chimeric Construct with Bovine Chondrocytes in a Devitalized Chick Knee”, *Tissue Engineering*, v. 9, n. 5, pp. 949-959, 2003.