

## **INFLUÊNCIA DA TAXA DE CONGELAMENTO NA VELOCIDADE DE SUBLIMAÇÃO DURANTE O PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO DE UM PRODUTO IMUNOBiolÓGICO**

Sérgio Luiz de Lima Assumpção  
Biotecnologista Bio-Manguinhos / Fiocruz  
sergio.luiz@bio.fiocruz.br  
Celso de Farias Crespo  
Biotecnologista Bio-Manguinhos / Fiocruz

### **Resumo**

Diante da importância em se conhecer a correlação entre as variáveis controláveis dos processos de liofilização e o impacto dessas nos parâmetros de qualidade estabelecidos por agências reguladoras de produtos de saúde pública, o objetivo deste trabalho foi verificar a sensibilidade da formulação de um produto imunobiológico específico a duas taxas de congelamento diferentes e avaliar a correlação entre essas taxas e a velocidade de sublimação alcançada durante o processo de liofilização, avaliando os parâmetros de qualidade estipulados por agências regulatórias: umidade residual, potência, termoestabilidade, aspecto e solubilidade. Para isso, foram realizados experimentos com duas taxas de congelamento que, no primeiro experimento (lote A) foi de  $-0,22^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e no segundo experimento (lote B) foi de  $-1,77^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Para estes experimentos foi medida a velocidade de redução de massa durante a fase de sublimação no processo de liofilização através da metodologia de massa reduzida. Os efeitos relacionados com as taxas de congelamento na estabilidade do produto imunobiológico variam de forma significativa. O produto imunobiológico avaliado se mostrou sensível diante das duas taxas de congelamento aplicadas. Com o controle de parâmetros do processo de liofilização, em especial a nucleação, é possível reduzir o tempo secagem e conseqüentemente o tempo total do processo. A taxa de congelamento de  $-0,22^{\circ}\text{C}/\text{min}$  pode ser utilizada como uma taxa de congelamento adequada ao processo de liofilização do produto imunobiológico estudado, uma vez que esta condição otimizou o tempo de redução de massa durante a etapa de sublimação e sobretudo preservou os requisitos da qualidade de produto final.

**Palavras-Chave:** Liofilização, preservação, nucleação, vacinas.

## **Introdução**

A liofilização é uma técnica de preservação que remove a água de uma solução a níveis muito baixos nos quais as atividades biológicas ou reações químicas sejam inibidas (JENNINGS, 1999). De forma simples, podemos desmembrar o processo de liofilização em três etapas básicas: o congelamento, a sublimação (secagem primária) e a dessorção (secagem secundária). O congelamento é a primeira etapa no processo de liofilização, é uma das etapas mais críticas desse processo. Nesta etapa, o produto é submetido a uma temperatura extremamente baixa e a probabilidade de que algum dos constituintes do produto não esteja cristalizado é muito pequena. Isso garante que o produto ultrapasse sua temperatura de cristalização e que esteja congelado por completo (JENNINGS, 1999). No processo de liofilização, a formulação é inicialmente congelada para posterior remoção da água por meio de sublimação e dessorção.

Durante o processo, a temperatura deve ser mantida em níveis suficientemente baixos para evitar a fusão da fase congelada. Tal condição é obtida ao mesmo tempo em que se mantém um alto vácuo na câmara de secagem, normalmente a uma pressão de vapor inferior a que corresponde a da superfície do gelo a mesma temperatura. O processo de liofilização somente pode ser executado quando a pressão de vapor do gelo e a temperatura do sistema estiverem abaixo do ponto triplo. Com vistas a obter a máxima velocidade de liofilização, é fundamental que sejam favorecidas as condições de suprimento de calor e de sublimação nas condições de alto vácuo consideradas (JENNINGS, 1999).

Com o controle de parâmetros físicos e químicos é possível inibir ou fomentar a etapa de nucleação e, portanto, do crescimento de qualquer sistema. A velocidade de congelamento influencia tanto a localização onde o cristal de gelo é formado, podendo ser em regiões intracelular ou extracelular em função da concentração de solutos, bem como no tamanho e na quantidade dos cristais de gelo (TATTINI et al., 2006).

Largamente divulgado na literatura, sabe-se que com altas taxas de congelamento, ocorrerá a formação de pequenos cristais de gelo em grande

quantidade com o mínimo deslocamento de água. Quando se opta por um congelamento lento, obtêm-se cristais de tamanho maior, fazendo com que haja a ruptura das células e injúria celular por força do aumento da pressão osmótica e a precipitação irreversível ou a desnaturação dos constituintes coloidais da célula. (TATTINI et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi verificar a sensibilidade da formulação de um produto imunobiológico específico a duas taxas de congelamento diferentes e avaliar a correlação entre essas taxas e a velocidade de sublimação alcançada durante o processo de liofilização para uma possível otimização do tempo de redução de massa durante a etapa de sublimação avaliando os requisitos da qualidade de produto final: umidade residual, potência, termoestabilidade, aspecto e solubilidade. Racionalizando os custos com insumos e energia relacionados à produção deste imunobiológico específico desenvolvendo a utilização consciente dos recursos naturais e ecológicos disponíveis a tal fim.

### **Metodologia ou Materiais e Métodos**

- Evolução temporal da redução de massa.

Na avaliação da redução de massa durante a sublimação da formulação, foi utilizada uma metodologia sistematizada de pesagem de amostras. Para isso, um conjunto de 50 frascos-amostras foi preparado, inicialmente, com a identificação dos frascos. Os frascos foram pesados vazios, e esses valores foram registrados numa planilha de controle do experimento. Em seguida, esses frascos-amostras foram envasados, novamente pesados e tiveram esses valores registrados na planilha. Assim, foi obtida a massa inicial do produto que foi envasado em cada frasco subtraindo os valores da massa do frasco envasado da massa do frasco vazio.

- Controle estatístico do volume de envase

O volume de envase é um parâmetro importante para o processo de liofilização e tem um forte impacto no tempo necessário às secagens primária e secundária dos produtos liofilizados. Nesses experimentos, o volume de envase foi definido para 0,50mL. Antes de se proceder ao envase dos frascos utilizados nos experimentos, é preciso ajustar a dosadora para o volume desejado através de um

método de pesagem simples referenciado no valor da densidade do produto imunobiológico ( $d=1,06$  g/mL) e descrito analiticamente como a razão entre a massa (g) e o volume (mL).

Envase em dosadora semiautomática Bausch Stroebel modelo EDM 3295 A dosadora funciona com bombas de êmbolo rotativo que permitem dosar volumes de 0,12 – 1,1mL. O conjunto de formatos inclui mangueiras de sucção em silicone, bomba de êmbolo rotativo, conexões em aço inoxidável e agulha de enchimento em aço inoxidável. Esta dosadora possui acabamento geral exterior com materiais não corrosíveis. Antes de se proceder ao envase dos frascos utilizados nos experimentos foi preciso ajustar a dosadora para o volume desejado. Inicialmente, ajustou-se a manivela da dosadora para o volume desejado, e em seguida procedeu-se um ajuste fino por de um método de pesagem simples. Para a pesagem dos frascos, utilizou-se a balança analítica Sartorius modelo FC06BBE-S. Retirada de amostras com o braço mecânico do liofilizador Liomaster PC 1.0 Durante a fase de secagem primária e secundária foram retiradas amostras com o auxílio do braço mecânico do Lyoflex. Neste experimento foram retirados de três a quatro frascos-amostras a cada intervalo de 3 horas. O tempo em que foram retiradas da câmara, o respectivo número de identificação do frasco-amostra e a massa final do produto foram registrados em planilha.

- Tratamento computacional dos dados experimentais

O tratamento dos dados experimentais foi feito computacionalmente utilizando-se o Origin 8.6, que é um programa para análise de dados, ajuste de curvas, representação gráfica de funções entre outras ferramentas matemáticas. (BARTHEM, 2002). Para avaliar a evolução temporal da redução de massa nos processos utilizados, aplicamos o conceito de massa reduzida.

- Análises de umidade residual por titulação coulométrica

Precedendo a análise propriamente dita, reduziu-se a umidade presente no recipiente contendo o reagente Karl Fischer, de modo que este atingiu valores da ordem de 5%. Na sequência, com o líofilo macerado, determinou-se, com o uso de

balança analítica Sartorius, a massa do produto que foi dispensada na célula tituladora do equipamento, até que este, após um intervalo de tempo, apresentou na sua tela o valor percentual da umidade residual presente na amostra.

- **Determinação da potência e termoestabilidade**

As placas foram alocadas em incubadora a temperatura de 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa de 95%, por um período de 24 horas. As quatro últimas diluições da suspensão viral foram utilizadas para a quantificação viral. As placas foram incubadas por 1 hora em estufa de 37°C com 5% CO<sub>2</sub> para adsorção do vírus. Após a incubação, novamente as placas foram incubadas a 38°C com 5% de CO<sub>2</sub> por mais sete dias.

- **Revisão por inspeção visual**

A Inspeção foi realizada por dois operadores certificados internamente e com exame de acuidade visual em dia em visores contendo fundo duplo, um contraste entre o preto e o branco, para auxiliar a visualização da amostra. Os lotes A e B foram inspecionadas utilizando um quantitativo de três frascos por vez para cada lote revisado. Os frascos foram agitados e submetidos a movimentos de rolamento sobre a bancada dos visores, e assim verificado o volume final do produto, o aspecto do líófilo bem como sua estrutura e coloração.

- **Teste de solubilidade**

O teste de solubilidade foi realizado para avaliar a reconstituição do produto liofilizado dos dois lotes, A e B após seus respectivos processamentos. A água WFI foi utilizada como diluente para a realização do teste. O volume de 2,5 mL foi dosado lentamente ao frasco contendo o líófilo com o auxílio de uma agulha e seringa durante dez segundos. O frasco foi agitado suavemente sem permitir a formação de espuma para a obtenção de uma suspensão uniforme. O tempo foi cronometrado até a reconstituição completa do produto.

## **Resultados e discussão**

O estudo demonstrou, por meio dos resultados do comportamento da temperatura média dos produtos, da evolução temporal da redução de massa, das análises de umidade residual, dos testes de potência, termoestabilidade, aspecto e solubilidade que os parâmetros de qualidade se mantêm preservados em função da utilização das duas taxas de congelamento diferentes.

- Evolução temporal da redução de massa

Para cada processamento foi medida a evolução temporal da redução de massa durante a sublimação onde se observam duas curvas ajustadas sobre as condições de processamento. Para um aumento de oito vezes entre as taxas de congelamento do lote A e do lote B, o tempo para se atingir níveis estáveis de redução de massa foi reduzido na metade.

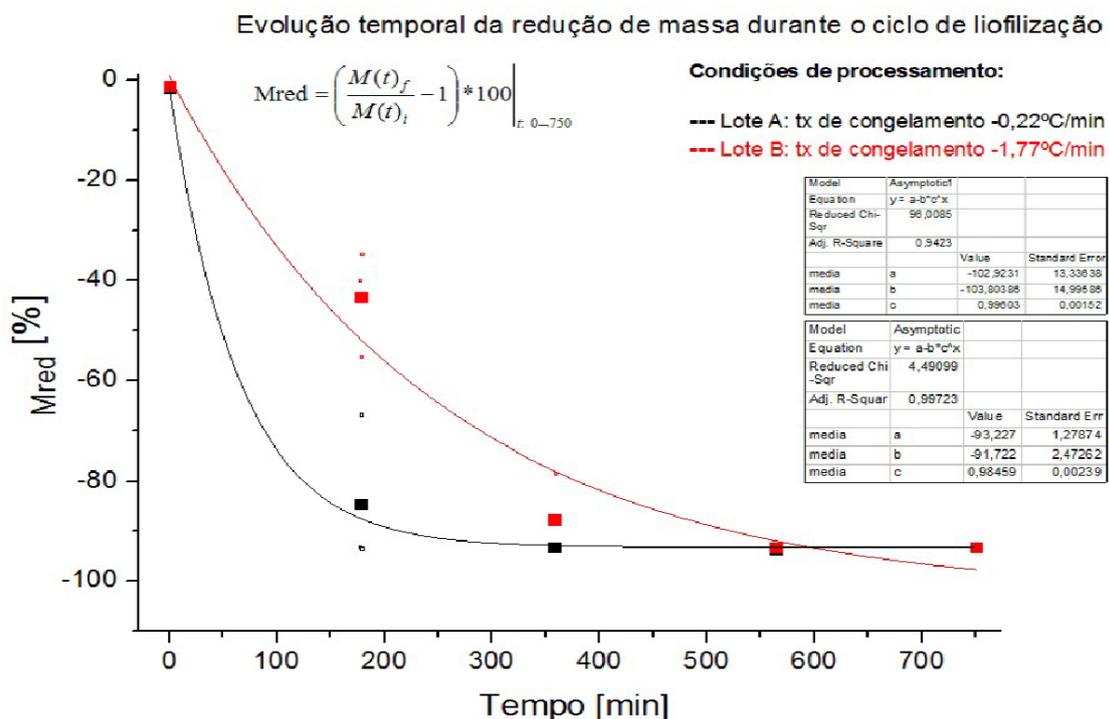


Figura 1 - Evolução temporal da redução de massa durante a sublimação.

- Análise de umidade residual por titulação coulométrica

A avaliação do teste estatístico t-Student aplicado às médias das umidades residuais dos dois lotes, A e B apresentou o valor  $\cong 0,8735 < 2,101$  (valor limite da

tabela t). Foi concluído ao nível de significância de 5%, que as médias das umidades residuais dos lotes A e B não possuem flutuação significativa.

Tabela 1 – Análise de umidade residual

Amostra	Lote A		Lote B	
	Massa (g)	UR (%)	Massa (g)	UR (%)
01	0,082	0,628	0,089	0,869
02	0,084	0,735	0,087	0,862
03	0,084	0,845	0,088	0,908
04	0,084	0,742	0,089	1,148
05	0,084	0,987	0,087	1,039
06	0,087	0,954	0,087	0,771
07	0,084	0,943	0,088	0,869
08	0,087	0,802	0,086	0,842
09	0,085	0,766	0,087	0,878
10	0,083	1,009	0,089	0,718
$\bar{m}$		0,841		0,890
$s^2$		0,01625344		0,01521644
$s$		0,127		0,123

- Determinação da potência e termoestabilidade

A avaliação do teste estatístico t-Student aplicado às médias das termoestabilidades dos dois lotes, A e B apresentou o valor  $\cong 1,9685 < 2,101$  (valor limite da tabela t). Foi concluído ao nível de significância de 5%, que as médias das potências dos lotes A e B não possuem flutuação significativa.

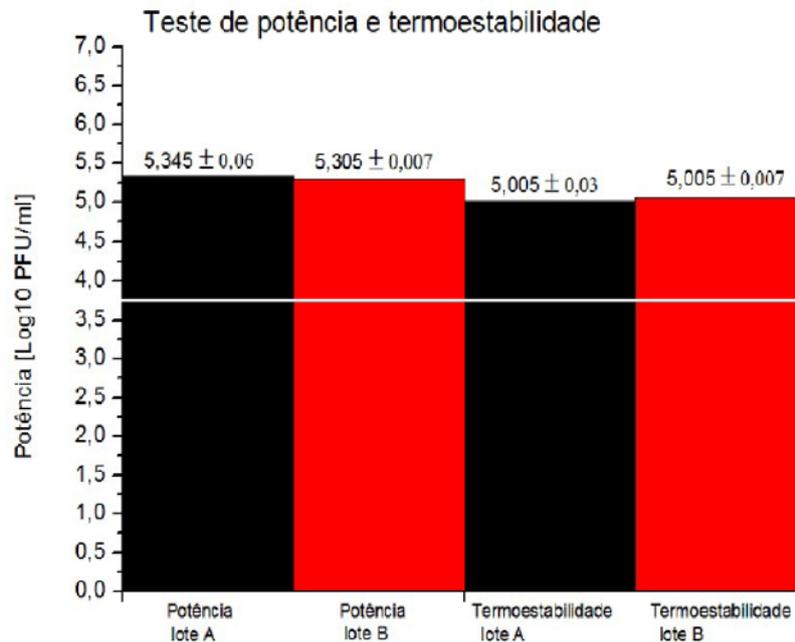


Figura 2 – Teste de potência e termoestabilidade.

- Revisão por inspeção visual

A revisão por inspeção visual do produto liofilizado realizada dos dois lotes, A e B apresentou o volume final conforme o volume inicial do produto, o aspecto do líofilo íntegro e solto do fundo do frasco, sua estrutura homogênea e sua coloração branca. Assim, foi concluído que os lotes A e B não possuem diferença significativa em relação ao aspecto do produto final.

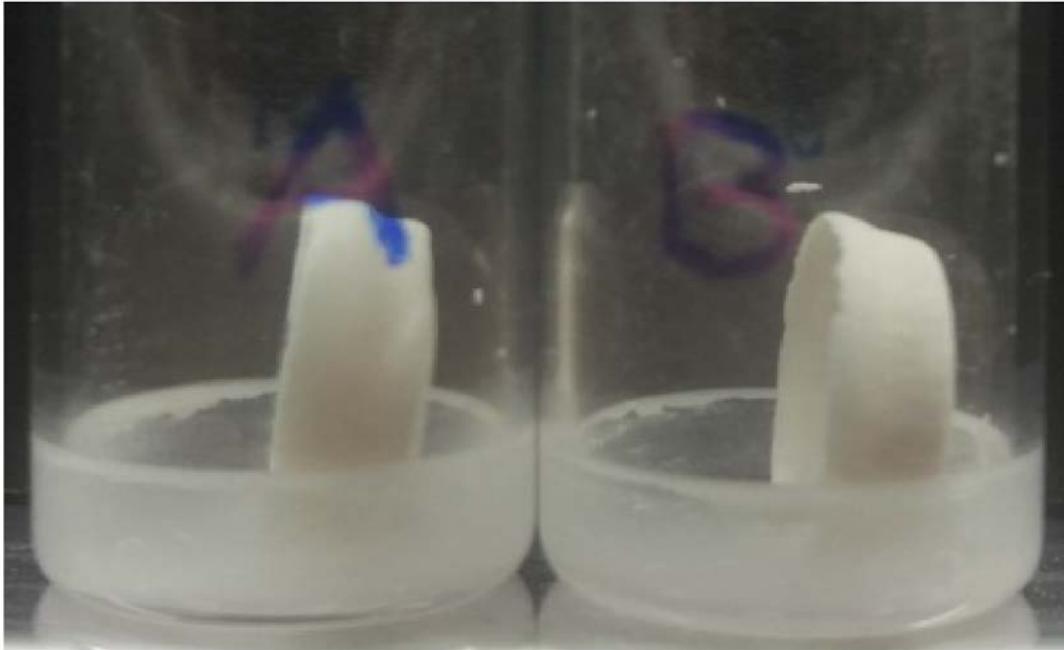


Figura 3 – Revisão por inspeção visual.

- Teste de solubilidade

O teste de solubilidade do produto liofilizado realizado dos dois lotes, A e B apresentou uma obtenção de uma suspensão uniforme sem formação de grumos ou filamentos. A reconstituição completa do produto durou cerca de dois minutos. Assim, foi concluído que os lotes A e B não possuem diferença significativa em relação a solubilidade do produto final.

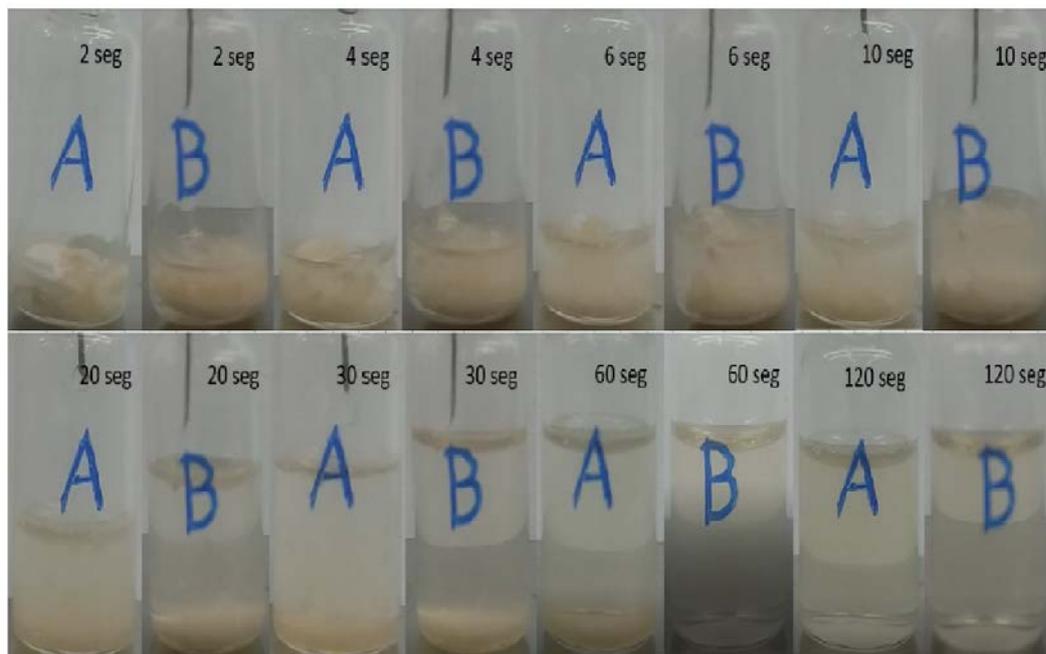


Figura 4 – Teste de solubilidade.

### Conclusão

O produto imunobiológico avaliado se mostra sensível diante das duas taxas de congelamento aplicadas, o que abre portas para a otimização do tempo necessário para completar a fase de sublimação no ciclo de liofilização. A utilização da taxa de congelamento de  $-0,22^{\circ}\text{C}/\text{min}$  se mostra favorecida, uma vez que a velocidade de sublimação para esta condição de congelamento se apresenta mais acelerada, racionalizando, assim, os custos com insumos e energia relacionados à produção deste imunobiológico específico.

### Agradecimentos

Agradeço ao Núcleo de Liofilização Experimental de Bio-Manguinhos / Fiocruz, a Sociedade Internacional de Liofilização, e a toda comunidade científica ligada ao desenvolvimento tecnológico, ensino e aprendizado de diferentes técnicas de preservação e processamento final de imunobiológicos.

### Referências

Barthem, Ricardo Borges. **Tratamento e Análise de dados em Física Experimental**. 4.ed. Sub-reitoria de ensino de graduação e corpo discente, RJ, BR. CCMN, CLA.1997.

Cameron, Peter. **Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice**. 1.ed. ISBN 1482207842, 9781482207842, USA. CRC Press. 1997.

Jr, V.T.; Parra, D.F.; Pitombo, R.N.M. **Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, vol. 42, n.1, jan./mar., 2006.

Oliveira, Sérgio Dias. **Estudo para otimização do ciclo de liofilização da vacina contra Febre Amarela 05 doses**. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, BR. 2003.

Reisdorfer, Francis Carazzai. **Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses**. Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, BR. 2011.

Thomas, A. Jennings. **Lyophilization, Introduction and Basic Principles**. 1.ed. Englewood, CO 80112-5776, USA. Intherpharm Press. 1999.