

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde – Vacinas e
Biofármacos

Jéssica Soares Cardoso

**Influência dos métodos de liofilização e evaporação na imunogenicidade
de preparações vacinais contendo sílica SBA-15 como adjuvante**

São Paulo

2023

Jéssica Soares Cardoso

Influência dos métodos de liofilização e evaporação na imunogenicidade de preparações vacinais contendo sílica SBA-15 como adjuvante

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador (a): Milene da Silva Tino

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Cardoso, Jéssica Soares

Influência dos métodos de liofilização e evaporação na imunogenicidade de preparações vacinais contendo sílica SBA-15 como adjuvante / Jéssica Soares Cardoso ; orientador(a) Milene da Silva Tino - São Paulo, 2023.

38 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Anticorpos 2. BSA. 3. Imunização . 4. SBA-15 I. Tino, Milene da Silva. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Jéssica Soares Cardoso, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 11 de janeiro de 2023.

.....
Aluna *Jéssica Soares Cardoso*

De acordo:.....
Orientadora *Mylene Silva Tiro*

Ao meu noivo por todo amor e apoio fundamentais para a minha formação.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu noivo por todo amor, apoio e por ter me incentivado muito a ingressar no programa.

À minha família pelo apoio.

Aos meus amigos, em especial Bianca Natasha Oliveira de Moraes, Grazielly Monteiro de Sales e Ana Paula Peixoto, por tornarem os meus dias mais divertidos.

À minha orientadora Milene por todos ensinamentos, paciência e confiança.

A todo pessoal do laboratório que me ensinou novas técnicas que irão complementar minha formação e me ajudaram nos meus experimentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

CARDOSO, Jéssica Soares. **Influência dos métodos de liofilização e evaporação na imunogenicidade de preparações vacinais contendo sílica SBA-15 como adjuvante**. 2023. 38 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para Saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

As vacinas são biofármacos que tem como objetivo a indução da resposta imune contra um determinado antígeno. Essa resposta pode ser aumentada pela utilização de adjuvantes. Há grande interesse no desenvolvimento de novos adjuvantes, uma vez que não são muitos os aprovados para uso humano. Os antígenos que compõem as vacinas são biomoléculas como proteínas, polissacarídeos ou ácidos nucleicos, cuja estabilidade pode ser afetada por fatores como temperatura e umidade. Por esse motivo, muitos biofármacos são apresentados em estado sólido, obtido através da evaporação do solvente por algum método de secagem, como liofilização ou evaporação. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se há interferência dos métodos de liofilização e evaporação na imunogenicidade de preparações vacinais contendo sílica SBA-15 como adjuvante. Para isso, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados por via subcutânea com preparações de BSA encapsulado em sílica na proporção de 1:10 e 1:25 (preparações normais) e com as mesmas preparações após liofilização e evaporação. O grupo controle foi imunizado apenas com BSA. As imunizações foram realizadas nos dias 0 e 40. Foram obtidos soros no dia 0 (SP), 30 dias depois da primeira imunização (resposta primária - RP30) e 30 dias depois da segunda imunização (resposta secundária - RS30). Os títulos de anticorpos anti-BSA nos soros foram determinados por ELISA. Não houve diferença estatística na resposta imunogênica entre os grupos imunizados com as preparações normal, liofilizada ou evaporada, independente da proporção antígeno/sílica utilizada e do tipo de resposta, RP ou RS. Também foi evidenciado o papel adjuvante da sílica SBA-15 em imunizações por via subcutânea. Esses resultados demonstraram que os métodos de liofilização e evaporação, não influenciaram na produção de anticorpos, podendo ser utilizados a fim de melhorar a estabilidade do imunizante, promovendo maior *shelf life* e facilitando o transporte do produto.

Palavras-chave: Anticorpos. BSA. Imunização. SBA-15. Secagem.

ABSTRACT

CARDOSO, Jéssica Soares. **Influence of lyophilization and evaporation on immunogenicity of vaccine preparations containing SBA-15 silica**. 2023. 38 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Vaccines are biopharmaceuticals which aim to induce an immune response against a certain antigen. This immune response can be increased by using adjuvants. There is a lot of interest in developing new adjuvants, since few of them are approved for human use. Vaccines antigens are biomolecules such as proteins, polysaccharides or nucleic acids, whose stability could be affected by temperature and humidity. For this reason, many biopharmaceuticals are presented in solid state, which is obtained through solvent elimination by some methods, including freeze drying and evaporation. Thus, the objective of this work was to verify if there is interference of lyophilization and evaporation in the immunogenicity of vaccine preparations containing SBA-15 silica. Female BALB/c mice were immunized subcutaneously with BSA encapsulated in SBA-15 at 1:10 and 1:25 mass ratios (normal preparations) and with the same ones after lyophilization and evaporation processes. The control group was immunized only with BSA. Animals were immunized on days 0 and 40. Blood samples were collected before immunization (day 0), 30 days after the first immunization (primary response - PR30) and 30 days after the second immunization (secondary response - SR30). The anti BSA antibody titers were determined by ELISA assay. There was no statistically difference immunogenic response between the groups immunized with normal, lyophilized or evaporated preparations regardless of antigen/silica ratio or response type. This results demonstrated that freeze drying and evaporation methods did not interfere in the antibodies' production and could be used to improve the stability of vaccine preparations, promoting greater shelf life and facilitating the transport of product.

Keywords: Antibodies. BSA. Dry. Immunization. SBA-15.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de funcionamento do processo de secagem por liofilização	15
Figura 2 - Mudança de fase líquida para vapor	15
Figura 3 - Esquema de evaporação de gota de água.....	16
Figura 4 - Títulos de IgG anti-BSA obtidos na SP, RP30 e RS30 produzidos por camundongos BALB/c imunizados com BSA (controle) ou preparação BSA:M5 normal, liofilizada ou evaporada, na proporção 1:10	26
Figura 5 - Títulos de IgG anti-BSA obtidos na SP, RP30 e RS30 produzidos por camundongos BALB/c imunizados com BSA (controle) ou preparação BSA:M5 normal, liofilizada ou evaporada, na proporção 1:25	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de animais formados de acordo com o tipo de imunizante ao qual foram submetidos.....	24
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Biofármacos	13
1.1.1 Liofilização.....	13
1.1.2 Evaporação	15
1.2 Resposta Imunológica	17
1.2.1 Vacinas.....	18
1.3 Adjuvantes	19
1.3.1 SBA-15	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Animais	23
3.2 Preparação das amostras	23
3.3 Imunização dos Animais	23
3.4 Titulação de anticorpos	24
3.5 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biofármacos

Os biofármacos são produtos compostos por biomoléculas como peptídeos, proteínas, glicoproteínas e ácidos nucleicos, estando incluídos nessa classificação os anticorpos, proteínas recombinantes, enzimas, hormônios e vacinas, por exemplo (WALSH, 2010; SHARMA *et al.*, 2021). A estabilidade das proteínas que compõem esses biofármacos pode ser afetada pela temperatura, umidade, cisalhamento e oxidação decorrentes do prolongado tempo de armazenamento (CHANG; PIKAL, 2009; GERVASI *et al.*, 2018), mesmo armazenadas a temperatura de 2-8 °C, em soluções aquosas pode ocorrer degradações químicas ou físicas (IZUTSU, 2018).

Devido essa falta de estabilidade, muitos biofármacos são apresentados em estado sólido, que é obtido através de alguma técnica de secagem do produto, o que acaba estendendo o *shelf-life* e facilitando o transporte (CHEN *et al.*, 2021; CHANG; PIKAL, 2009). A secagem pode ser feita utilizando como mecanismo a evaporação comum, feita em estufa, por exemplo, ou a vácuo; evaporação e atomização, que é a secagem por pulverização; sublimação, quando é feita liofilização; e, fluido supercrítico, que utiliza a precipitação como mecanismo (EMAMI *et al.*, 2018).

1.1.1 Liofilização

A liofilização é um processo de secagem utilizado para conservação de produtos, através da sublimação da água após congelamento. A liofilização é largamente utilizada nas indústrias de biotecnologia, farmacêuticas e biomédicas para conservação de produtos como antibióticos, proteínas, hormônios, vírus, bactérias, leveduras e vacinas (VARSHNEY; SING, 2015).

O processo de liofilização é composto por 3 etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária (Figura 1). No congelamento, o produto é congelado de modo que seja criada uma matriz adequada para secagem; na secagem primária ocorre a remoção da água por sublimação através do aumento da pressão no ambiente onde se encontra o produto, enquanto mantém a temperatura em níveis baixos; na secagem secundária, por sua vez, acontece a remoção da água ligada, até que o produto atinja o nível desejado de umidade residual (LIU; ZHOU, 2021).

O congelamento é responsável por imobilizar os componentes da solução e induzir uma estrutura de cristal de gelo que irá ditar o comportamento da liofilização.

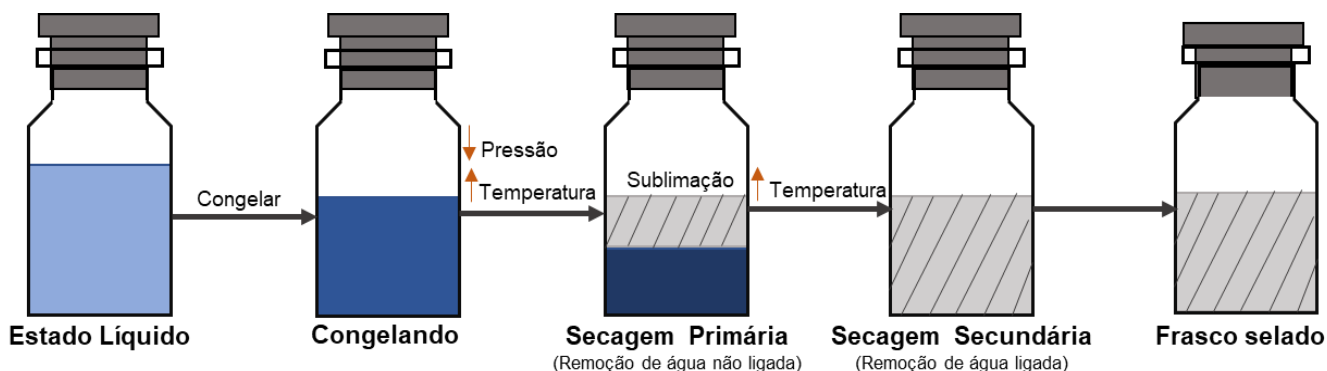
Uma taxa lenta de congelamento ($0,1 - 0,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), pode acarretar na formação de grandes cristais de gelo próximos entre si, que pode ser útil na liofilização de solutos que relutam para cristalizar. Por outro lado, o congelamento a uma taxa lenta pode inativar um bioproduto devido à longa exposição ao concentrado de soluto. No entanto, o congelamento com taxa rápida pode induzir formação de muitos cristais pequenos de gelo orientados aleatoriamente dentro de uma matriz de soluto amorfa, dificultando a liofilização. Desse modo, a escolha da taxa de congelamento deve ser de acordo com o produto que será liofilizado (WARD; MATEJTSCHUK, 2021).

O processo da secagem primária se inicia com a diminuição da pressão da câmara, a fim de que a pressão parcial da água se mantenha abaixo de sua pressão de vapor, garantindo a direta conversão de líquido em vapor. Além disso, a diminuição da pressão ocasiona o aumento da taxa de sublimação, pois reduz a concentração de vapor acima da amostra, o que permite que ocorra resistência mínima das moléculas de água que migram do produto (WARD; MATEJTSCHUK, 2021).

Durante a secagem primária, a temperatura do produto deve se manter $2-3 \text{ }^\circ\text{C}$ abaixo da temperatura máxima permitida, que no caso de um produto que tenha matriz amorfa é a temperatura de transição vítrea da solução concentrada no máximo congelamento (T_{g0}) ou da temperatura de colapso (T_c) (DEPAZ; PANSARE; PATEL, 2016). A temperatura de transição vítrea é definida como a faixa de temperatura em que o produto transita de um estado vítreo duro para um estado emborrachado (ROOS, 2010). Secagens acima dessas temperaturas, T_{g0} e T_c , podem acarretar no colapso do “bolo” a ser liofilizado, resultando em impactos negativos nos aspectos de qualidade do produto (DEPAZ; PANSARE; PATEL, 2016).

Na secagem secundária, ocorre aquecimento do “bolo” poroso por tempo de 3-25 h, que representa cerca de 10-20% do tempo total de secagem. Nesse processo é removido qualquer água que ainda esteja ligada, a fim de obter umidade final menor ou igual a 1% (STRATTA *et al.*, 2020; REXROAD *et al.*, 2002; YOON; NARSIMHAN, 2022). Nessa fase a taxa de secagem é reduzida em relação a secagem primária devido a pouca quantidade de água, alta resistência ao calor e transporte de massa através da camada de material poroso (NOWAK; JAKUBCZYK, 2020).

Figura 1 - Esquema de funcionamento do processo de secagem por liofilização



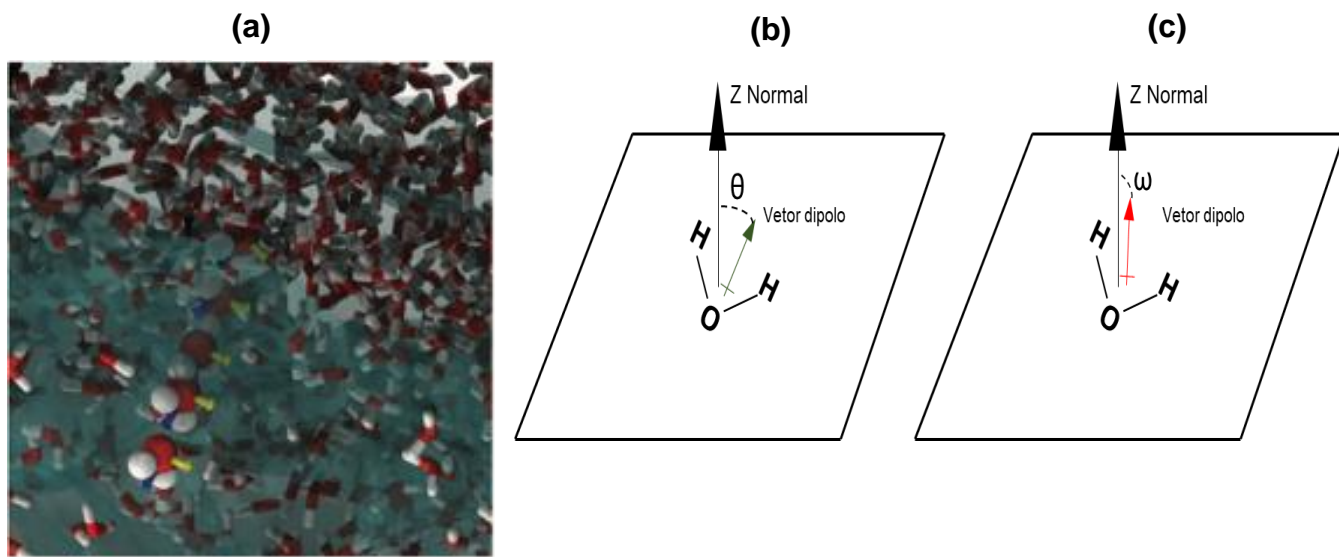
Fonte: Adaptado de SHARMA *et al.*, 2021.

1.1.2 Evaporação

A evaporação é um fenômeno no qual ocorre a transformação da água em seu estado líquido para o vapor. A transição líquido-vapor tem início com a formação do núcleo de bolha de vapor dentro do líquido. A nucleação das bolhas pode ser atingida através do aumento da temperatura do líquido ou diminuição da pressão até a pressão de saturação na temperatura utilizada (DAVOODABADI; GHASEMI, 2021).

A molécula de água passa por várias fases antes de evaporar. Inicialmente, a molécula se difunde em direção à interface (Figura 2a). Depois, ela entra na interface interna, enquanto seu vetor dipolo e uma ligação O-H giram no plano para ficar voltado para fora (Figura 2b e 2c). Então, a molécula de água perde uma das ligações de hidrogênio e gira de modo a ficar com a orientação mais voltada para o exterior, perdendo as ligações de hidrogênio doador e receptor e, com seu dipolo com orientação quase normal à interface, para doar sua ligação de hidrogênio restante (MUSOLINO; TROUT, 2013).

Figura 2 - Mudança de fase líquida para vapor

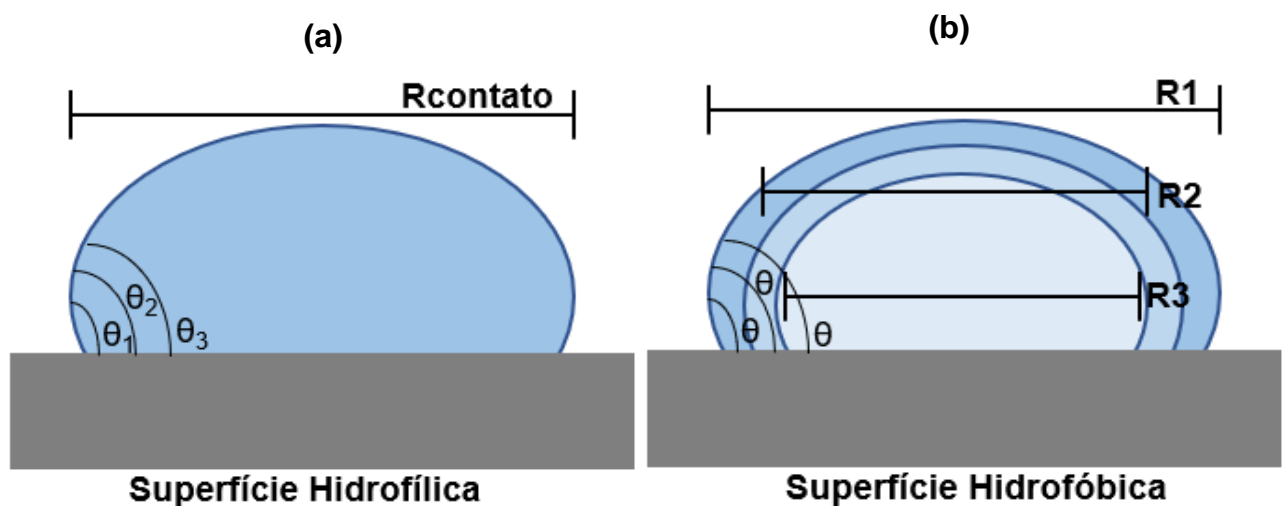


Fonte: (a) MUSOLINO; TROUT, 2013; (b) e (c) Adaptado de MUSOLINO; TROUT, 2013.

Legenda: (a) Molécula de água passa através do volume para a superfície, modificando sua orientação antes de deixar a fase líquida; (b) Angulação do vetor dipolo com eixo Z; (c) Ângulo do dipolo normal com o eixo Z

A evaporação de gotas em superfícies hidrofílicas ou hidrofóbicas pode ocorrer de dois modos: raio de contato constante (RCC) (Figura 3a) e ângulo de contato constante (ACC) (Figura 3b). O RCC ocorre em superfícies hidrofílicas, onde a gota se espalha na superfície e fica fixa. Durante a evaporação, o raio de contato permanece constante, enquanto que o ângulo de contato varia. No caso do modo ACC, devido a hidrofobicidade, o ângulo de contato permanece constante, enquanto que o raio de contato varia (LEE *et al.*, 2022; HASAN; SOBOLEV; NOSONOVSKY, 2021).

Figura 3 - Esquema de evaporação de gota de água



Fonte: Adaptado de LEE *et al.*, 2022.

Legenda: (a) Raio de contato constante (RCC); (b) Ângulo de contato constante (ACC)

Com o processo de evaporação, acaba ocorrendo a concentração dos solutos do sistema (ROGER; SPARR; WENNERSTROM, 2018). Essa característica pode ser explorada para realização de dessalinização de água do mar (GUAN; GUO; YU, 2021) ou utilizada na indústria de alimentos, como na transformação de leite líquido em leite em pó e produção de açúcar (BHANDARI, 2013), por exemplo.

Alguns estudos com materiais com atividade antimicrobiana vêm utilizando a evaporação como processo de secagem. Xiao *et al.* (2018) utilizaram evaporação para produção de um enxerto de gentamicina ligado covalentemente a uma esponja de nanofibras de celulose com acetoacetato de celulose, Franco (2018) por sua vez, utilizou evaporação em estufa como processo de secagem para obtenção de extrato de *Piptadenia gonoacantha*, que apresentou resultados de atividade antimicrobiana.

Além disso, a secagem por spray-drying vem sendo reconhecida como um método eficiente de secagem de produtos biofarmacêuticos (ZIAEE *et al.*, 2019). KANOJIA *et al.* (2016) estudaram a aplicação do processo de spray-drying para evaporação do solvente da vacina da influenza de vírus inteiro inativado. Eles observaram que o antígeno vacinal permaneceu estável por 3 meses a temperatura de 60 °C. CHEN *et al.* (2010) desenvolveram um estudo em escala piloto para produção de vacina recombinante contra hepatite B, utilizando o processo de spray-drying para evaporação do solvente. Eles observaram que essas formulações vacinais se mantiveram estáveis por 24 meses a temperatura de 37 °C.

1.2 Resposta Imunológica

O sistema imunológico é mediado pelas respostas inata e adaptativa (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2019). O sistema imune inato é a primeira barreira de defesa contra organismos invasores (LEE; CHANNAPPANAVAR; KANEGGANTI, 2020), sendo composta por células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DC) e *natural killer* (NK) (KAUR; SECORD, 2019).

As células do sistema imune inato reconhecem microrganismos invasores através dos PRRs (pattern-recognition receptors), que são os receptores de reconhecimento padrão, capazes de reconhecer certos padrões moleculares associados aos patógenos, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)

presentes nos microrganismos (BRUBAKER *et al.*, 2015). Além disso, outro método de defesa são as células NK, que atuam destruindo células tumorais espontaneamente (KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975), as quais possuem poucas moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I (MHC classe I) em sua superfície (JONCKER; RAULET, 2008).

A imunidade adaptativa é aquela que surge em decorrência da exposição à agentes infecciosos (antígeno) e que tem sua capacidade imunogênica aumentada em decorrência da exposição sucessiva ao mesmo antígeno. Essa resposta imune é mediada pelos linfócitos, que são células que possuem vários receptores, sendo capazes de reconhecer grande variedade de antígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

As principais populações de linfócitos envolvidos na imunidade adaptativa são os linfócitos T e B. Os linfócitos T amadurecem no timo e são responsáveis pela imunidade mediada por células, enquanto que os linfócitos B, amadurecem na medula óssea e são responsáveis pela produção de anticorpos (imunoglobulinas) (BONILLA; OETTGEN, 2010).

As imunoglobulinas são proteínas e existem em 5 isotipos: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. A IgG é a proteína mais abundante presente no soro humano, sendo subdividida nas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). As imunoglobulinas IgG1 e IgG3 são as mais envolvidas na resposta imune contra antígenos proteicos, enquanto que IgG2 é vista em respostas contra polissacarídeos (NAPODANO *et al.*, 2021). IgG4, por sua vez, é formada após exposição ao antígeno em ambiente não infeccioso (AALBERSE *et al.*, 2009; VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014), além de ser encontrada devido contaminação com helmintos (ADJOBIMEY; HOERAUF, 2010).

1.2.1 Vacinas

As vacinas são biofármacos que têm como objetivo a indução da resposta imune contra um determinado antígeno, possibilitando a detenção de uma infecção antes que ela se estabeleça (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Existem as vacinas vivas atenuadas, produzidas com vírus vivo atenuado. Elas são obtidas através da passagem sucessiva do vírus em cultura celular com intuito de enfraquecê-lo (HUSSEIN *et al.*, 2015). Também, existem as vacinas inativadas que englobam as

vacinas de célula inteira inativada e as de subunidades, que são aquelas que contêm partes do antígeno. As vacinas de subunidades podem ser produzidas utilizando proteínas ou polissacarídeos, sendo incluídas as vacinas de toxóides e VLPs (Virus Like Particle) (VETTER *et al.*, 2018).

O tipo de resposta imune ativada após a vacinação varia de acordo com o tipo de vacina utilizada, podendo ser adquirida a capacidade de prevenir infecções através da produção de anticorpos neutralizantes e da capacidade de induzir respostas de células T e B de memória (VERCH; TRAUSCH; SHANK-RETZLAFF, 2018). As vacinas de vírus vivo atenuado induzem resposta humoral e celular, pois atuam simulando uma infecção viral leve por uma cepa do vírus que foi atenuada (NUWARDA; ALHARBI; KAYSER, 2021).

A vacina de toxóide, por sua vez, é produzida através da destoxificação de toxinas bacterianas (HUSSEIN *et al.*, 2015). A toxina tetânica, por exemplo, é gerada pela bactéria *Clostridium tetani*, que sendo destoxificada por formaldeído, compõe uma vacina contra o tétano (TICHA *et al.*, 2021). As vacinas de toxóides geram resposta imune através da indução de anticorpos antitoxina (WHO, 2018). As vacinas de subunidades muitas vezes podem perder componentes que desencadeiam a ativação da resposta imune inata devido aos processos de purificação aos quais são submetidas. Isso pode acabar reduzindo a imunogenicidade dessas vacinas em comparação com as vacinas vivas e de célula inteira inativada, necessitando assim que sejam adicionados adjuvantes (VETTER *et al.*, 2018).

1.3 Adjuvantes

Os adjuvantes são substâncias que, quando adicionadas as vacinas, podem ampliar a resposta imune e melhorar a resposta de memória, fazendo com que possa ser reduzida a quantidade de antígeno utilizado em cada dose vacinal (DI PASQUALE *et al.*, 2015; VETTER *et al.*, 2018). Além disso, os adjuvantes também podem induzir o aumento da resposta imune em populações más respondedoras à vacina, como é o caso dos imunocomprometidos, idosos e crianças (SUN *et al.*, 2018; COFFMAN; SHER; CEDER, 2010).

Dentre os adjuvantes aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em vacinas humanas, estão os sais de alumínio, emulsões água-óleo como o MF59 e monofosforil lipídio A (SHI *et al.*, 2019). Os compostos de alumínio tem sido

os mais utilizados como adjuvantes em vacinas humanas e de animais nos últimos 90 anos (WEN; SHI; 2016). Estes compostos aumentam a imunidade humoral, estimulando células Th2 (BREWER *et al.*, 1999). Desse modo, uma das suas limitações é a capacidade de induzir respostas de Th1 e CTLs (Linfócitos T citotóxicos), necessário ao controle de patógenos intracelulares (REED *et al.*, 2008).

1.3.1 SBA-15

As sílicas nanoestruturadas são biomateriais (HAO; LI; TANG, 2017) compostos de óxido de silício (SiO_2) (GAO *et al.*, 2022) e possuem estrutura de mesoporos uniforme. Além disso, esses biomateriais possuem poros tanto na parte interna quanto em sua superfície e têm a capacidade de abrir ou fechar seus poros de acordo com o pH do meio, o que torna o material interessante para carrear fármacos (NARAYAN *et al.*, 2018).

O primeiro sólido mesoporoso foi sintetizado por Mobil Research and Development Corporation em 1992, ao qual foi nomeado de Mobil Crystalline Materials (MCM-41), feito a partir de géis de aluminossilicato (KRESGE *et al.*, 1992). No entanto, vários outros materiais com natureza mesoporosa foram desenvolvidos variando matéria-prima e condições de reação, como é o caso da SBA-15 (NARAYAN *et al.*, 2018).

A sílica denominada de SBA-15 é um copolímero tribloco não iônico descrito em 1998 (ZHAO *et al.*, 1998). Recebeu esse nome por ter sido sintetizada pela primeira vez na Universidade da Califórnia, em Santa Bárbara e, por ser um material amorfo, foi designada como Santa Bárbara Amorphous, nº15 (SBA-15) (NARAYAN *et al.*, 2018). A SBA-15 é produzida em meio ácido utilizando o copolímero tribloco $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$ [poli (óxido de etileno) - poli (óxido de propileno) - poli (óxido de etileno)] como precursor. Após a calcinação, é removido o polímero e obtido a sílica, que tem seus mesoporos organizados hexagonalmente (ZHAO *et al.*, 1998).

A SBA-15 também é um biomaterial com interesse para utilização como adjuvante de vacinas. Mercuri *et al.* (2006) estudaram camundongos BALB/c, assim como camundongos geneticamente selecionados para alta (High - H) e baixa produção de anticorpos (Low - L). Eles obtiveram títulos de anticorpos maiores ou iguais quando imunizados com proteína de *E. coli* (Int1 β) encapsulada em SBA-15 em

comparação com Int1 β emulsificado com Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), que é o adjuvante mais comumente utilizado em vacinas animais.

Carvalho *et al.* (2010) também compararam a ação adjuvante da SBA-15 em camundongos geneticamente selecionados para a alta (High III) e baixa (Low III) resposta de anticorpos. Eles imunizaram esses animais por via intramuscular (IM) com albumina sérica bovina (BSA) encapsulada em SBA-15 ou emulsificada com IFA. Verificaram então que não houve diferença na produção de anticorpos obtida para os animais imunizados com SBA-15 em relação aos animais imunizados com o adjuvante comercial. Além disso, verificaram que o BSA encapsulado na sílica induziu a produção de IgG anti-BSA nos animais Low III de maneira semelhante aos títulos obtidos pelos camundongos High III após 14 d da primeira imunização.

Mechler-Dreibi *et al.* (2021), imunizaram suínos por via oral (OR) com *Mycoplasma hyopneumoniae* usando sílica SBA-15 como adjuvante e compararam com a vacina comercial aplicada por via intramuscular e com animais controle (não imunizados). Verificaram que, assim como a vacina comercial, o protocolo de imunização com sílica, apresentou redução de lesões nos pulmões em comparação aos animais não vacinados. Além disso, demonstraram que os suínos imunizados com vacina comercial apresentaram títulos de IgG, enquanto que os vacinados com protocolo de sílica apresentaram títulos de IgM.

Sabendo que as vacinas na forma sólida possuem várias vantagens em relação às vacinas líquidas e, considerando que a SBA-15 vem sendo estudada como um potencial adjuvante de vacinas, se torna interessante a investigação da influência dos métodos de liofilização e evaporação na elaboração de uma preparação vacinal contendo SBA-15.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar se há interferência dos métodos de liofilização e evaporação na imunogenicidade de preparações vacinais contendo sílica SBA-15 como adjuvante.

2.2 Específicos

- a) Imunizar camundongos BALB/c com albumina sérica bovina (BSA) e sílica SBA-15 lote M5 (BSA:M5), utilizando preparo normal do imunizante, liofilizado e evaporado;
- b) Verificar se há diferença de resposta imune de anticorpos devido aos diferentes preparos do imunizante;
- c) Verificar se há diferença na produção de anticorpos utilizando preparo de BSA:M5 normal, liofilizado e evaporado com proporção antígeno/SBA-15 de 1:10 e 1:25 para cada procedimento.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas de 20 g foram cedidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Foram mantidos em ambientes com temperatura, umidade e luminosidade controladas (ciclo 12 h claro/escuro). Os protocolos experimentais para uso desses animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (CEUAIB 2666080319).

3.2 Preparação das amostras

A sílica SBA-15 lote M5, assim como a BSA, que foi utilizado como antígeno, foram cedidos pelo Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema.

As amostras vacinais foram preparadas em duplicatas, contendo 10 µg de BSA incorporadas em 100 µg de M5 (1:10) ou em 250 µg de M5 (1:25) em um volume final de 200 µl de tampão PBS, pH 7,4. Após um período de 16 h a 4 °C, um grupo passou por processo de liofilização que consistiu em congelamento a -25°C e posterior secagem em liofilizador (Liobras, Brasil) a -52 °C sob vácuo de 4,7 kPa durante 48 h. O outro grupo de amostras foi evaporado em estufa 30 °C por 24 h. Tanto as amostras liofilizadas quanto evaporadas foram mantidas a 4 °C e ressuspendidas em água destilada no máximo 30 min antes da inoculação nos animais. Nesse momento, outro grupo de amostras com as mesmas concentrações foi preparado sem sofrer nenhum tratamento, além de uma amostra controle contendo somente BSA.

3.3 Imunização dos Animais

Os camundongos BALB/c foram separados em 7 grupos de acordo com o tipo de tratamento ao qual seriam submetidos, conforme apresentado na Tabela 1. Todos os animais foram imunizados por via subcutânea (SC) nos dias 0 e 40 de experimento. Amostras de sangue foram coletadas por meio de punção do plexo retroorbital dos camundongos antes da primeira imunização (sangria prévia - SP), após 30 dias da primeira imunização (RP30) e após 30 dias da segunda imunização (RS30).

Tabela 1 - Grupos de animais formados de acordo com o tipo de imunizante ao qual foram submetidos

Grupos	Tratamento	Número de animais (n)
BSA:M5_1:10N	Preparação normal 1:10	4
BSA:M5_1:25N	Preparação normal 1:25	5
BSA:M5_1:25L	Liofilizado 1:25	4
BSA:M5_1:10L	Liofilizado 1:10	5
BSA:M5_1:10E	Evaporado 1:10	4
BSA:M5_1:25E	Evaporado 1:25	5
BSA	Controle BSA	4

Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: N: normal; L: liofilizada; E: evaporada.

3.4 Titulação de anticorpos

Os soros obtidos foram utilizados para titulação de anticorpos IgG anti-BSA através de ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) com protocolo adaptado conforme descrito por CARVALHO, 2010.

No ensaio de ELISA, 96 poços de uma microplaca foram sensibilizados com 100 μL de uma solução contendo 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA (Sigma), diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M (pH=9,5), sendo incubada a 4 °C overnight. Antes de realizar o bloqueio, foi feita a lavagem da placa em lavadora de microplacas (Thermo Scientific, China) com 3 ciclos de 300 μL , utilizando o tampão PBS contendo 0,05% (v.v⁻¹) de Tween 20 (PBS-T). A placa foi posteriormente bloqueada com 200 μL /poço de PBS-T + gelatina 0,01% por 1 h em estufa (FANEM, Brasil) a 37 °C.

As amostras foram adicionadas na placa e diluídas em tampão PBS-T + gelatina 0,01% de forma seriada (fator 2) e volume final de 50 μL , sendo incubadas por 1 h a 37 °C. Após lavagem com PBS-T, foi adicionado 50 μL /poço de anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com enzima peroxidase (KPL, EUA) na proporção de 1:7500, sendo igualmente incubado por 1 h a 37 °C.

Após esse período, foi feito novo ciclo de lavagem com PBS-T. Então, foi adicionado 50 μL da solução substrato, composta por 0,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de o-fenilnediamina (Sigma) e 20 μL peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Synth) 30% diluídos em tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH=5,0) por 15 min em temperatura ambiente e acondicionado ao abrigo de luz. A reação enzimática foi finalizada com a adição de

50 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 N. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, EUA) com comprimento de onda de 490 nm. Os títulos de anticorpos foram calculados como o inverso da diluição do soro correspondente a absorbância de dois desvios acima da média obtida a partir de um pool de soros normais e expressa como $[\log_2 (\bar{X} \pm \text{EP})]$.

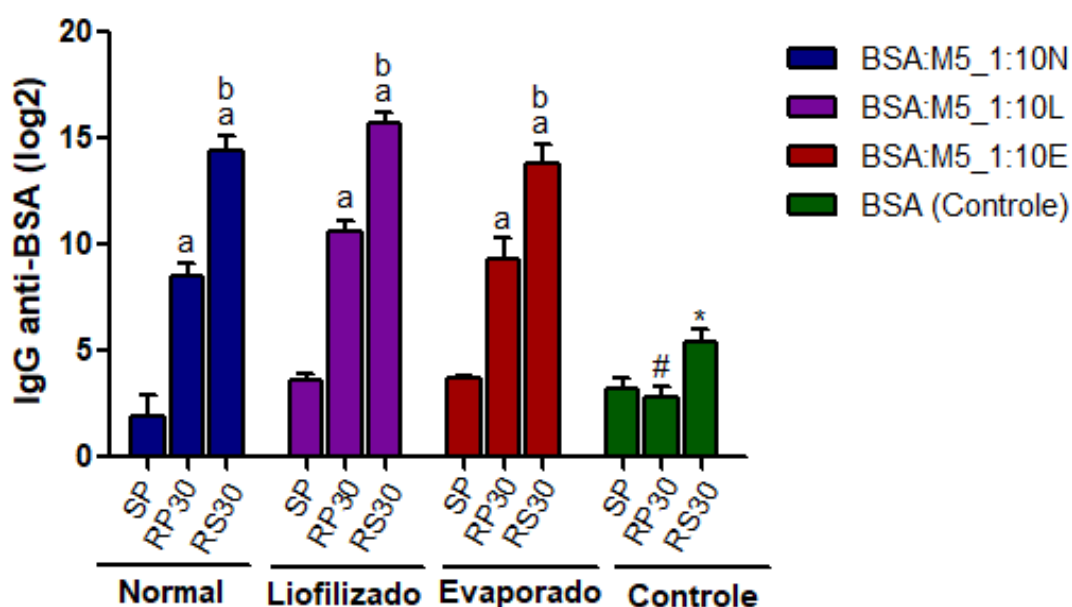
3.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como as médias dos valores $(\bar{X}) \pm$ erro padrão (EP). A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey com 95% de confiança ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Os camundongos BALB/c imunizados com o complexo BSA e sílica (BSA:M5) com preparação normal, liofilizado ou evaporado na proporção de 1:10 não apresentaram diferença significativa na produção de anticorpos ($p > 0,05$) tanto na resposta primária quanto na resposta secundária, conforme Figura 4. Os grupos BSA:M5_1:10N, BSA:M5_1:10L e BSA:M5_1:10E apresentaram títulos médios de IgG na RP30 de $8,48 \pm 0,66 \log_2$, $10,59 \pm 0,49 \log_2$ e $9,35 \pm 0,94 \log_2$ respectivamente. Esses grupos também apresentaram títulos médios de IgG na RS30 de $14,40 \pm 0,71 \log_2$ (BSA:M5_1:10N), $15,70 \pm 0,55 \log_2$ (BSA:M5_1:10L) e $13,84 \pm 0,88 \log_2$ (BSA:M5_1:10E).

Figura 4 - Títulos de IgG anti-BSA obtidos na SP, RP30 e RS30 produzidos por camundongos BALB/c imunizados com BSA (controle) ou preparação BSA:M5 normal, liofilizada ou evaporada, na proporção 1:10.



Fonte: próprio autor, 2023.

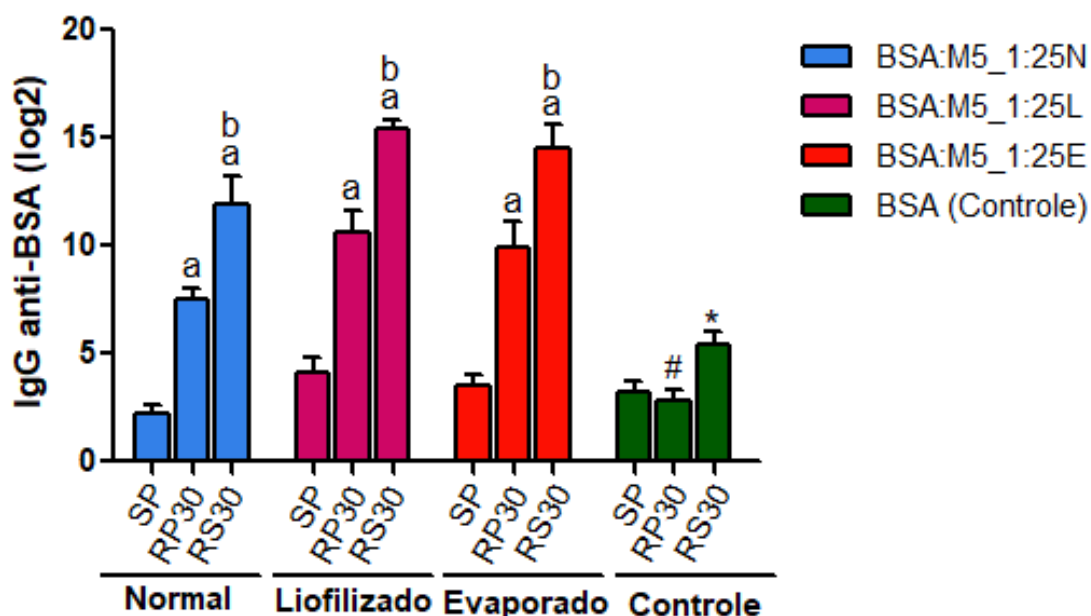
Legenda: * $p < 0,05$ = comparação entre o grupo Controle em relação aos demais grupos na RS30.

$p < 0,05$ = comparação entre o grupo Controle em relação aos demais grupos na RP30.

a $p < 0,05$ = comparação entre RP30/RS30 e SP nos grupos BSA:M5_1:10N, BSA:M5_1:10L, BSA:M5_1:10E

b $p < 0,05$ = comparação entre RS30 e RP30 nos grupos BSA:M5_1:10N, BSA:M5_1:10L, BSA:M5_1:10E

Figura 5 - Títulos de IgG anti-BSA obtidos na SP, RP30 e RS30 produzidos por camundongos BALB/c imunizados com BSA (controle) ou preparação BSA:M5 normal, liofilizada ou evaporada, na proporção 1:25.



Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: * $p < 0,05$ = comparação entre o grupo Controle em relação aos demais grupos na RS30.

$p < 0,05$ = comparação entre o grupo Controle em relação aos demais grupos na RP30.

a $p < 0,05$ = comparação entre RP30/RS30 e SP nos grupos BSA:M5_1:25N, BSA:M5_1:25L, BSA:M5_1:25E

b $p < 0,05$ = comparação entre RS30 e RP30 nos grupos BSA:M5_1:25N, BSA:M5_1:25L, BSA:M5_1:25E

Da mesma maneira, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nas respostas de anticorpos dos animais imunizados com preparação vacinal na proporção de 1:25, normal, liofilizadas ou evaporadas (Figura 5). Esses grupos apresentaram títulos médios de IgG na RP30 de $7,52 \pm 0,47$ log2 (BSA:M5_1:25N), $10,60 \pm 1,01$ log2 (BSA:M5_1:25L) e $9,94 \pm 1,20$ log2 (BSA:M5_1:25E). Ademais, apresentaram títulos médios de IgG na RS30 de $11,88 \pm 1,31$ log2 (BSA:M5_1:25N), $15,37 \pm 0,42$ log2 (BSA:M5_1:25L) e $14,53 \pm 1,08$ log2 (BSA:M5_1:25E).

Verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na produção de anticorpos pelos grupos imunizados com BSA:M5 na proporção de 1:10 ou 1:25. Também é possível observar nas Figuras 4 e 5 que os grupos imunizados com

BSA:M5 com preparação normal, liofilizada ou evaporada apresentaram maior produção de anticorpos ($p < 0,05$) tanto na RS30, quanto na RP30 em comparação com o controle sem SBA-15. Além disso, todos os grupos imunizados com BSA:M5 com preparação normal, liofilizado ou evaporado apresentaram títulos de anticorpos significativamente maiores na RP30 em relação à SP, assim como da RS30 em relação à RP30 e SP.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi estudada a influência dos processos de liofilização e evaporação na resposta imunogênica de preparações vacinais utilizando sílica M5 como adjuvante. Foi verificado que não houve diferença significativa na produção de anticorpos entre os grupos que sofreram ou não esses tratamentos. Além disso, não houve diferença entre os grupos que foram imunizados com proporção de antígeno/SBA-15 de 1:10 e 1:25, independente se a preparação do imunizante foi normal, liofilizada ou evaporada.

A mesma resposta imunológica obtida com preparação normal, liofilizada ou evaporada do imunizante indica que a sílica protegeu a albumina durante o processo de secagem por liofilização ou evaporação, aos quais ocorrem em condições adversas de temperatura e pressão (SHARMA *et al.*, 2021). Segundo Lim *et al.* (2016), o processo de liofilização possui componentes estressores como temperatura fria, mudança de pH, mudança de fase, aumento de concentração e taxa de congelamento que podem ocasionar na desnaturação das proteínas.

Tattini, Parra e Pitombo (2006), observaram que o congelamento lento da albumina sérica bovina, com taxa de $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ocasionou o desdobramento irreversível após reidratação da proteína. Essa taxa de congelamento foi obtida armazenando-se a amostra em ultrafreezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h (TATTINI; PARRA; PITOMBO, 2006). Song, Lee, Han (2016), por sua vez, verificaram que a liofilização de BSA sem crioprotetores pode ocasionar na perda de estabilidade proteica quando submetida a temperaturas acima da temperatura ambiente. Neste trabalho, foi feito o congelamento das amostras a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, provavelmente resultando em uma taxa mais lenta que a obtida por Tattini, Parra e Pitombo (2006). No entanto, foram obtidos títulos de anticorpos semelhantes aos obtidos com a imunização com amostra normal, demonstrando que possivelmente não houve desdobramento irreversível do BSA mesmo com essa taxa de congelamento. Isso pode ter acontecido devido a proteção da M5, que pode ter atuado como crioprotetor, corroborando assim com os resultados obtidos por Song, Lee, Han (2016).

A liofilização é um dos métodos mais utilizados para secagem de biofármacos (CHEN; KRISTENSEN, 2009). Porém, a secagem por spray-drying também é utilizada, podendo ser aplicada na produção de vacinas (PRESTON; RANDOLPH, 2021). O processo de spray-drying (atomização) utiliza a evaporação como

mecanismo de remoção de solvente (AMERI; MAA, 2006), que foi o mecanismo utilizado para secagem do complexo imunizante BSA:M5_1:10E e BSA:M5_1:25E neste trabalho, porém realizado em estufa laboratorial. Não foram encontrados na literatura estudos utilizando secagem de biofármacos em estufas, apenas secagem por atomização. Durante esse tipo de secagem, pode ocorrer estresse por cisalhamento ou desnaturação proteica por contato com gases aquecidos (PRESTON; RHANDOLPH, 2021). No caso de evaporação em estufa, sendo efetuada a 30 °C nesse trabalho, pode não ter ocorrido desnaturação do BSA, visto que sua temperatura de desnaturação é de aproximadamente 50 °C (SEHN, 2009).

Jones *et al.* (2017) estudaram a pré-formulação de uma vacina de segunda geração contra Anthrax utilizando como processo de evaporação de solvente a secagem por spray-drying. Eles obtiveram uma formulação que se manteve estável a temperatura de 40 °C durante 3 meses. Esse período de estabilidade foi próximo ao encontrado por Hasset *et al.* (2015). Hasset *et al.* (2015) também formularam uma vacina contra Anthrax, porém, utilizaram a secagem por liofilização. Verificaram que apenas após 4 meses a 40 °C a vacina começou a perder sua estabilidade. Além disso, eles observaram que a mesma formulação de vacina, quando mantida em meio líquido a temperatura de 40 °C tinha sua imunogenicidade diminuída após 2 meses, indicando que a retirada do solvente beneficia o período de estabilidade adquirido.

Os animais imunizados com complexo BSA:M5 com preparação normal, liofilizada ou evaporada e proporção de antígeno para sílica de 1:10 ou 1:25, apresentaram maior título de anticorpos ($p < 0,05$) em relação aos camundongos imunizados somente com BSA. Esse resultado demonstrou que a sílica teve um efeito potencializador da resposta imunológica e demonstrando seu potencial como adjuvante de vacinas, o que corrobora com os resultados encontrados por Carvalho *et al.* (2010).

A resposta secundária (RS30) nos grupos experimentais apresentou níveis superiores de IgG anti-BSA em comparação a resposta primária (RP30), o que ocorreu porque após a primeira imunização, toda cascata imunológica foi ativada, gerando linfócitos T e B de memória capazes de montar uma resposta imune adaptativa mais rápida em uma segunda infecção (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

Por outro lado, o grupo controle, imunizado somente com BSA apresentou títulos semelhantes em todas as coletadas estudadas. Isto pode demonstrar que a

albumina sozinha não foi suficiente para induzir a produção de anticorpos de memória. Relacionando isto com o fato de que os demais 6 grupos receberam a mesma quantidade de antígeno, porém, com utilização de adjuvante e que apresentaram aumento no título de anticorpos, podemos inferir que a M5 aumentou a resposta de anticorpos, atuando como um adjuvante.

A sílica SBA-15 vem sendo estudada há vários anos como um possível adjuvante. Scaramuzzi *et al.* (2011), verificaram que a imunização subcutânea de camundongos BALB/c com a proteína de superfície (HbsAg) do vírus de hepatite-B em humanos (HBV) encapsulado em SBA-15 (HbsAg:SBA-15) apresentou produção de anticorpos IgG anti-HbsAg, assim como os camundongos imunizados com preparação vacinal contendo Al (OH)₃. Esses resultados corroboram com os encontrados neste trabalho, reforçando a atuação positiva da sílica.

Rasmussen *et al.* (2020) imunizaram camundongos BALB/c por via subcutânea com anatoxina diftérica encapsulada em SBA-15 e compararam com a utilização de hidróxido de alumínio (Al (OH)₃) como adjuvante. Observaram que os camundongos imunizados com o complexo imunizante que continha a sílica apresentaram maiores títulos de anticorpos em relação ao imunizante que continha Al(OH)₃, indicando o potencial da SBA-15 como novo adjuvante vacinal.

Em um recente trabalho, Trezena *et al.* (2022) também demonstraram o papel adjuvante da sílica SBA-15 em imunizações subcutâneas. Eles demonstraram que a SBA-15 aumenta a imunogenicidade das anatoxinas diftéricas e tetânicas, principalmente quando administradas em conjunto. Além disso, também verificaram que os animais maus produtores (Low III) de anticorpos tiveram sua resposta de anticorpos modulada pela sílica, fazendo com que esses animais passassem a produzir títulos de anticorpos semelhantes aos animais bons respondedores (High III).

A variação não significativa entre os títulos de anticorpos obtidos entre os grupos imunizados com preparo normal em relação aos grupos com imunizante liofilizado ou evaporado indica que os métodos de secagem podem ser utilizados para produção de vacinas utilizando SBA-15, uma vez que não interferiram na resposta imunológica. Desse modo, sabendo que as biomoléculas são mais instáveis com maior presença de umidade (CHANG; PIKAL, 2009), a liofilização ou evaporação possibilitam maior tempo de vida de prateleira por promoverem maior estabilidade do produto, além de requererem cadeia fria de distribuição menos rigorosa (PRESTON; RHANDOLPH, 2021).

6 CONCLUSÃO

Os processos de liofilização e evaporação não influenciaram na resposta imunológica dos camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com complexo BSA e SBA-15.

REFERÊNCIAS¹

- AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O.; SCHUURMAN, J.; RISPENS, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clin. Exp. Allergy**, v. 39, p. 469-477, 2009.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9^a Edição. Elsevier, 2019.
- ADJOBIMEY, T.; HOERAUF, A. Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 104, p. 455-464, 2010.
- AMERI, M.; MAA, Y. F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v. 24, p. 763-768, 2006.
- BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. A. Adaptative immunity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.125, p. 33-40, 2010.
- BHANDARI, B. Introduction to food powders. In: BHANDARI, B.; BANSAL, N.; ZHANG, M.; SCHUCK, P. **Handbook of Food Powders**. Woodhead Publishing, 2013.
- BREWER, J. M.; CONACHER, M.; HUNTER, C. A.; MOHRS, M.; BOMBACHER, F.; ALEXANDER, J. Aluminium Hydroxide Adjuvant Initiates Strong Antigen-Specific Th2 Responses in the Absence of IL-4- or IL-13-Mediated Signaling. **J. Immunol.**, v. 163, p. 6448-6454, 1999.
- BRUBAKER, S. W.; BONHAM, K. S.; ZANONI, I.; KAGAN, J. C. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. **Annu Rev Immunol.**, v. 33, p. 257-290, 2015.
- CARVALHO, L. V. RUIZ, R. C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E. B.; MATOS, J. R.; TAMBOURGI, D. V.; FANTINI, M. C. A.; SANT'ANNA, O. A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, p. 7829-7836, 2010.
- CHANG, L. L.; PIKAL, M. J. Mechanisms of Protein Stabilization in the Solid State. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 2886-2908, 2009.
- CHEN, D.; KRISTENSEN, D. Opportunities and challenges of developing thermostable vaccines. **Expert Rev. Vaccines**, v. 8, p. 47-557, 2009.
- CHEN, D.; KAPRE, S.; GOEL, A.; SURESH, K.; BERI, S.; HICKLING, J.; JENSEN, J.; LAL, M.; PREAUD, J. M.; LAFORCE, M.; KRISTENSEN, D. Thermostable formulations of a hepatitis b vaccine and a meningitis a polysaccharide conjugate vaccine produced by a spray drying method. **Vaccine**, v. 28, p. 5093-5099, 2010.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

- CHEN, Y.; MUTUKURI, T. T.; WILSON, N. E.; ZHOU, Q. T. Pharmaceutical protein solids: drying technology, solid-state characterization and stability. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 172, p. 211-233, 2021.
- COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, v. 33, p. 492-503, 2010.
- DAVOODABADI, A.; GHASEMI, H. Evaporation in nano/molecular materials. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 290, 2021.
- DEPAZ, R. A.; PANSARE, S.; PATEL, S. M. Freeze-Drying Above the Glass Transition Temperature in Amorphous Protein Formulations While Maintaining Product Quality and Improving Process Efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 40-49, 2016.
- DI PASQUALE, A.; PREISS, S.; SILVA, F. T.; GARÇON, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. **Vaccines**, v. 3, p. 320-343, 2015.
- EMAMI, F.; VATANARA, A.; PARK, E. J.; NA, D. H. Drying Technologies for the Stability and Bioavailability of Biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**, v. 10, 2018.
- FRANCO, Adriane Jane. **JACBIO®: formulações dermocosméticas e/ou farmacêuticas à base de Piptadenia gonoacantha com atividade antimicrobiana e uso**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- GAO, Y.; ZHANG, Y.; HONG, Y.; WU, F.; SHEN, L.; WANG, Y.; LIN, X. Multifunctional Role of Silica in Pharmaceutical Formulations. **APS PharmSciTech**, v. 23, n, p. 1-18, 2022.
- GERVASI, V.; AGNOL, R. D.; CULLEN, S.; MCCOY, T.; VUCEN, S.; CREAN, A. Parenteral protein formulations: An overview of approved products within the European Union. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 131. p. 8-24, 2018.
- GUAN, W.; GUO, Y.; YU, G. Carbon Materials for Solar Water Evaporation and Desalination. **Small**, v. 17, 2021.
- HAO, N.; LI, L.; TANG, F. Roles of particle size, shape and surface chemistry of mesoporous silica nanomaterials on biological systems. **International Materials Reviews**, v. 56, p. 57-77, 2017.
- HASAN, M. D.; SOBOLEV, K.; NOSONOVSKY, M. Control of the Drying Patterns for Complex Colloidal Solutions and Their Applications. **Journal of Applied Physics**, v. 129, 2021.
- HASSET, K. J.; VANCE, D. J.; JAIN, N. K.; SAHNI, N.; RABIA, L. A.; COUSINS, M. C.; JOSHI, S.; VOLKIN, D. B.; MIDDAUGH, R.; MANTIS, N. J.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Glassy-State Stabilization of a Dominant Negative Inhibitor

Anthrax Vaccine Containing Aluminum Hydroxide and Glycopyranoside Lipid A Adjuvants. **J. Pharm. Sci.**, v. 104, p. 627-639, 2015.

HUSSEIN, I. H.; CHAMS, N.; CHAMS, S. EL SAYEGH, S.; BADRAN, R.; RAAD, M.; GERGES-GEAGEA, A.; LEONE, A.; JURJUS, A. Vaccines through centuries: major cornerstones of global health. **Front Public Health**, v. 3, 2015.

IZUTSU, K. I. Applications of Freezing and Freeze-Drying in Pharmaceutical Formulations. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1081, p. 371-383, 2018.

KANOJIA, G.; WILLEMS, G. J.; FRIJLINK, H. W.; KERSTEN, G. F. A.; SOEMA, P. C.; AMORIJ, J. P. A Design of Experiment approach to predict product and process parameters for a spray dried influenza vaccine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, p. 1098-1111, 2016.

JONCKER, N. T.; RAULET, D. H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. **Immunol Rev.**, v. 224, p. 85-97, 2008.

JONES, R. M.; BURKE, M.; DUBOSE, D.; CHICHESTER, J. A.; MANCEVA, S.; HORSEY, A.; STREATFIELD, S. J.; BREIT, J.; YUSIBOV, V. Glassy-State Stabilization of a Dominant Negative Inhibitor Anthrax Vaccine Containing Aluminum Hydroxide and Glycopyranoside Lipid A Adjuvants. **Vaccine**, v. 35, p.5463-5470, 2017.

KAUR, B. P.; SECORD, E. Innate Immunity. **Pediatr Clin North Am.**, v. 5, p. 905-911, 2019.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **Eur. J. Immunol.**, v. 5, p. 112-117, 1975.

KRESGE, C.T.; LEONOWICZ, M. E.; ROTH, W. J.; VARTULI, J. C.; BECK, J. S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid crystal template mechanism. **Nature**, v. 359, p. 710-712, 1992.

LEE, S.; M. A. T.; CHO, G.; LEE, J. Control of the Drying Patterns for Complex Colloidal Solutions and Their Applications. **Nanomaterials**, v. 12, 2022.

LEE, S. J.; CHANAPPANAVAR, R.; KANNEGANTI, T. D. Coronaviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. **Trends Immunology**, v. 41, 2020.

LIM, J. Y.; KIM, N. A.; LIM, D. G.; KIM, K. H.; CHOI, D. H.; JEONG, S. H. Process cycle development of freeze drying for therapeutic proteins with stability evaluation. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, p. 519-536, 2016.

LIU, B.; ZHOU, X. Freeze-drying of proteins. In: WOLKERS, W. F.; OLDENHOF, H. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, 4. ed. New York: Humana Press, 2021.

MECHLER-DREIBI, M. L.; ALMEIDA, H. M. S.; SONALIO, K.; MARTINES, M. A. C.; PETRI, F. A. M.; ZAMBOTTI, B. B.; FERREIRA, M. M.; STORINO, G. Y.; MARTINS, T. S.; MONTASSIER, H. J.; SANT'ANNA, O. A.; FANTINI, M. C. A.; OLIVEIRA, L. G. Oral vaccination of piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae* using silica SBA-15 as an adjuvant effectively reduced consolidation lung lesions at slaughter. **Sci. Rep.**, v. 11, 2021.

MERCURI, L. P.; CARVALHO, L. V.; LIMA, F. A.; QUAYLE, C.; FANTINI, M. C. A.; TANAKA, G. S.; CABRERA, W. A.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V.; MATOS, J. R.; JARONIEC, M.; SANT'ANNA, O. A. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new Effective adjuvant to induce antibody response. **Small**, v. 2, p. 254-256, 2006.

MUSOLINO, N.; TROUT, B. L. Insight into the molecular mechanism of water evaporation via the finite temperature string method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 138, 2013.

NAPODANO, C.; MARINO, M. P.; STEFANILE, A.; POCINO, K.; SCATENA, R.; GULLI, F.; RAPACCINI, G. L.; NOCI, S. D.; CAPOZIO, G.; RIGANTE, D.; BASILE, U. Immunological role of IgG subclasses. **Immunological Investigations**, v. 50, p. 427-444, 2021.

NARAYAN, R.; NAYAK, U. Y.; RAICHUR, A. M.; GARG, S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. **Pharmaceutics**, v. 10, 2018.

NOWAK, D.; JAKUBCZYK, E. The Freeze-Drying of Foods - The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. **Foods**, v. 9, 2020.

NUWARDA, R. F.; ALHARBI, A. A.; KAYSER, V. An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. **Vaccines**, v. 9, 2021.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature Medicine Supplement**, v. 11, p. 563-568, 2005.

PRESTON, K. B.; RANDOLPH, T. W. Stability of lyophilized and spray dried vaccine formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 171, p. 50-61, 2021.

RASMUSSEN, M. K.; BORDALLO, H. N.; BORDENALLI, M. A.; AKAMATSU, M. A.; TREZENA, A. G.; FRANCO, M. T.; SANT'ANNA, O. A.; MARTINS, T. S.; LOPES, J. L. S.; FANTINI, M. C. A.; OLIVEIRA, C. L. P. Assessing the efficiency of SBA-15 as a nanocarrier for diphtheria antitoxin. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 312, 2020.

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v.30, n.1, p. 23-32, 2008.

REXROAD, J.; WIETHOFF, C. M.; JONES, L. S.; MIDDGAUGH, C. R. Lyophilization and the Thermostability of Vaccines. **Cell Preservation Technology**, v. 1, p. 91-104, 2002.

ROGER, K.; SPARR, E.; WENNERSTROM, H. Evaporation, diffusion and self-assembly at drying interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, p. 10430-10438, 2018.

ROOS, Y. H. Glass Transition Temperature and Its Relevance in Food Processing. **Annual review of food science and technology**, v.1, p. 469-496, 2010.

SEHN, Elizandra. **Dinâmica da desnaturação térmica das proteínas do sangue e fotoestabilidade de formulações de uso tópico: Estudo quantitativo com métodos fototérmicos**. 2009. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

SHARMA, A.; KHAMAR, D.; CULLEN, S.; HAYDEN, A.; HUGHES, H. Innovative Drying Technologies for Biopharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 609, 2021.

SHI, S.; ZHU, H.; XIA, X.; LIANG, Z.; MA, X.; SUN, B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. **Vaccine**, v. 37, p. 3167-3178, 2019.

SCARAMUZZI, K.; OLIVEIRA, D. C. A.; CARVALHO, L. V.; TAMBOURGI, D. V.; TENÓRIO, E. C. N.; MUSSALEM, J.; FANTINI, M. C. A.; BOTOSSO, V. F.; SANT'ANNA, O. A. Nanostructured SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with hepatitis B vaccine. **Einstein**, v. 9, p. 436-441, 2011.

SONG, J. G.; LEE, S. H.; HAN, H. K. Biophysical evaluation of aminoclay as an effective protectant for protein stabilization during freeze-drying and storage. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 6609-6619, 2016.

STRATTA, L.; CAPOZZY, L. C.; FRANZINO, S.; PISANO, R. Economic Analysis of a Freeze-Drying Cycle. **Processes**, v. 8, 2020.

SUN, B.; YU, S.; ZHAO, D.; GUO, S.; WANG, X.; ZHAO, K. Polysaccharides as vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 36, p. 5226-5234, 2018.

TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, 2006.

TICHA, O.; KLEMM, D.; MOOS, L.; BEKEREDJIAN-DING, I. A cell-based in vitro assay for testing of immunological integrity of Tetanus toxoid vaccine antigen. **npj Vaccines**, v. 6, 2021.

TREZENA, A. G.; OSELIERO FILHO, P. L.; SILVA, L. C. C.; OLIVEIRA, C. L. P.; LOPES, J. L. S.; ANTONIO, N. S.; DETTMANN, V. F. B.; AKAMATSU, M. A.; MARTINS, T. S.; RIBEIRO, O. G.; FANTINI, M. C. A.; SANT'ANNA, O. A.; TINO DE FRANCO, M. Adjuvant effect of mesoporous silica sba-15 on anti-diphtheria and anti-tetanus humoral immune response. **Biologicals**, v. 80, p. 18-26, 2022.

VARSHNEY, D.; SINGH, M. History of lyophilization. In: VARSHNEY, D.; SINGH, M. **Lyophilized Biologics and Vaccines: modality-based approaches**. Springer, 2015.

VERCH, T.; TRAUSCH, J., J.; SHANK-RETZLAFF, M. Principles of vaccine potency assays. **Bioanalysis**, v. 10, p. 163-180, 2018.

VETTER, V.; DENIZER, G.; FRIEDLAND, L. R.; KRISHNAN, J.; SHAPIRO, M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of Medicine**, v. 50, p. 110-120, 2018.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Front. Immunol.**, 2014.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 917-924, 2010.

WARD, K. R.; MATEJTSCHUK, P. The Principles of Freeze-Drying and Application of Analytical Technologies. In: WOLKERS, W. F.; OLDENHOF, H. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, 4. ed. New York: Humana Press, 2021.

WEN, Y.; SHI, Y. Alum: an old dog with new tricks. **Emerg. Microbes Infect.**, v. 5, p. 1-5, 2016.

World Health Organization (WHO). **The immunological basis for immunization series: module 3: tetanus**, 2018.

XIAO, Y.; RONG, L.; WANG, B.; MAO, Z.; XU, H.; ZHONG, Y.; ZHANG, L.; SUI, X. A light-weight and high-efficacy antibacterial nanocellulose-based sponge *via* covalent immobilization of gentamicin. **Carbohydrate polymers**, v. 200, p. 595-601, 2018.

YOON, K.; NARSIMHAN, V. Understanding Heat Transfer During the Secondary Drying Stage of Freeze Drying: Current Practice and Knowledge Gaps. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 368-381, 2022.

ZHAO, D.; HUO, Q.; FENG, J.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 6024-6036, 1998.

ZIAEE, A.; ALBADARIN, A. B.; PADRELA, L.; FEMMER, T.; O'REILLY, E.; WALKER, G. spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 300-318, 2019.