

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**Estudo de estabilidade de uma proteína recombinante, baseada
na Proteína Circumsporozoíta de *Plasmodium vivax*, candidata a
vacina contra malária**

Janaína Tenorio Novais

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador:
Dr. Rodolfo Ferreira Marques

São Paulo

2021

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Irene da Silva Soares, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação durante minha Iniciação Científica, por 4 anos. Aprendi muito com a senhora, e sou eternamente grata a confiança que depositou e ainda deposita em mim.

Ao meu orientador, Dr. Rodolfo Ferreira Marques, por enxergar em mim muito mais do que eu mesma enxerguei, por ouvir todas as minhas ideias mirabolantes e me ensinar a filtrar as que eram ótimas, e por se tornar muito mais do que um orientador ou parceiro de laboratório para mim, e sim um grande amigo. Se hoje eu estou mais perto de me tornar uma cientista, devo grande parte disso a você.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto

Aos professores doutores Daniel Youssef Bargieri e Wagner Quintilio, pela presença na banca de defesa e todas as considerações que melhoraram esse trabalho.

À mestre e técnica do Laboratório de Parasitologia Clínica da FCF/USP, Kátia Sanches Françoso, por todo auxílio para que eu conseguisse finalizar esse trabalho da melhor forma possível.

Ao biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo (IQ/USP) e seus funcionários, em especial a Dr^a Flavia, por dispor da sua área experimental para a realização dos experimentos.

Aos técnicos de laboratório do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Felipe Augusto Dörr, Renata Albuquerque e Fabiana Teixeira, por toda a contribuição prestada neste trabalho.

Ao técnico de laboratório da Central Analítica do IQ-USP, Márcio Nardelli Wandermuren, e ao Pós-doutorando Glaucio Monteiro Ferreira, pelo auxílio na leitura das amostras e interpretação dos resultados de Dicroísmo Circular.

Ao professor Marco Antônio Stephano, pelo auxílio na liofilização das amostras usadas neste estudo.

As amigas e parceiras de laboratório Ana Caroline e Laura Lima, por toda contribuição em meu trabalho e por tornarem a jornada no laboratório muito mais divertida.

À minha mãe, Maria de Lourdes Tenório, por sempre acreditar em mim e jamais medir esforços para realizar meus sonhos. Sem você eu jamais estaria onde estou.

Ao meu pai, Wilson Roberto Novais, e meus irmãos, Júlia Tenorio Novais e Wilson Roberto Novais Júnior, pelo apoio incondicional até aqui.

Aos amigos Débora Ribeiro Oliveira, Karina Kanno, Patrícia Kataoka, Fernanda Kibe, Mariana Correia, Giovanna Reis, Ana Caroline, Nathalia Tenguan, Ivan Carlos, Thiago Martins, Priscilla Sobreira e Bruno Oliveira pela amizade, apoio e por ser minha válvula de escape nas épocas em que a graduação exigia tudo de mim.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. OBJETIVO(S)	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 – Sequência da proteína recombinante:.....	7
3.2 – Expressão das proteínas recombinantes:	7
3.3 – Purificação da proteína recombinante e diálise em diferentes tampões	7
3.4 – Processo de lyophilização:	9
3.5 – Temperaturas de armazenamento e pontos de análise do estudo de estabilidade:	9
3.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE):.....	10
3.7 – Western blot:	11
3.8 – Dicroísmo circular:	11
3.9 – Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC): ...	12
3.10 – Estudo de imunogenicidade em camundongos:	12
3.11 – Análise de anticorpos por ELISA:.....	13
3.12 – Determinação do pH:.....	14
3.13 – Análise estatística:	14
4. RESULTADOS	14
4.1 – Análise visual das amostras:.....	14
4.2 – Identidade da proteína:	15
4.3 – Caracterização por Dicroísmo Circular:	17
4.4 – Pureza por RP-HPLC:	18
4.5 – Análise do pH das amostras:.....	21
4.6 – Imunoensaios:	21
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES:.....	29
7. BIBLIOGRAFIA:.....	31
8. ANEXOS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Central Analítica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CRIOP	Crioprotetor
CSP	Proteína Circumsporozoíta
DC	Dicroísmo Circular
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMEA	<i>European Agency for the Evaluation of Medical Products</i>
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GSK	GlaxoSmithKline
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
IQ	Instituto de Química
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PNI	Programa Nacional de Imunização
SEC	<i>Size-exclusion chromatography</i>
s.c.	Subcutâneo
Tg	Temperatura de transição vítreia
Tc	Temperatura de colapso
USP	Universidade de São Paulo

RESUMO

NOVAIS, J.N. **Estudo de estabilidade de uma proteína recombinante, baseada na Proteína Circumsporozoíta de *Plasmodium vivax*, candidata a vacina contra malária.** 2021. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, ano.

Palavras-chave: Estabilidade; vacinas; malária; *Plasmodium vivax*

INTRODUÇÃO: A malária é um grave problema de saúde pública, que em 2019, causou aproximadamente 229 milhões de casos em todo o mundo. A prevenção dessa doença é necessária, e o desenvolvimento de vacinas contra malária torna-se extremamente fundamental. Porém, uma questão que necessita ser abordada é a capacidade de novas formulações se manterem estáveis até o momento de seu uso.

O desenvolvimento de formulações que possam ser armazenadas e permanecer biologicamente ativas até sua utilização, é um desafio a ser superado, e de alta relevância pensando-se nos locais aonde tal vacina é necessária.

OBJETIVO Realização de um estudo de estabilidade, durante seis meses, da proteína yPvCSP-Allct, potencial candidata à vacina contra malária *vivax*, em formulações líquida e liofilizadas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A proteína recombinante foi expressa a partir de leveduras *Pichia pastoris*, e purificada através de FPLC. O estudo de estabilidade das 3 formulações, uma líquida e duas liofilizadas, foi realizado durante 180 dias e em 3 diferentes temperaturas de armazenamento, através de testes como SDS-PAGE, *western blot*, DC, SEC, HPLC e ensaios de imunização.

RESULTADOS: A proteína recombinante, em formulação líquida, mostrou-se estável por 180 dias apenas quando armazenada a -20°C. Para as formulações liofilizadas, a proteína manteve-se sem sinais de degradação por seis meses quando armazenada a -20°C e a 5°C. Apesar disso, todas as formulações liofilizadas mostraram-se capazes de induzirem altos títulos de anticorpos.

CONCLUSÃO: Os presentes resultados demonstram que as formulações vacinais se mantiveram estáveis em algumas das condições testadas.

Considerando a dificuldade de manutenção da rede de frio em locais onde a malária é um problema endêmico, tais resultados são promissores.

1. INTRODUÇÃO

A malária é um sério problema de saúde global, e sem dúvida a doença parasitária tropical mais mortal do mundo. Em 2019, aproximadamente 229 milhões de casos foram registrados em todo o globo, e destes casos, 409 mil resultaram em morte. Estima-se que, atualmente, 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para a doença (CRAWLEY et al., 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Em todo o mundo, desde 2000, a incidência da doença está diminuindo, de 80 para 57 casos por 1000 habitantes em áreas de risco em 2019. Entretanto, nas amérias neste mesmo ano, houve um aumento da incidência, principalmente devido ao aumento de transmissão da malária na região venezuelana, que saltou de 35,5 mil casos em 2000 para 467 mil casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil em 2019, estima-se que 43 mil pessoas vivem em áreas de risco para malária, e o parasita *Plasmodium vivax* é o maior causador da doença no país, responsável por aproximadamente 86% dos casos registrados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Através dos dados apresentados, é notável a necessidade de prevenção e controle dessa doença, e apesar dos números preocupantes observados para malária causada por *Plasmodium vivax*, ainda não há nenhuma vacina licenciada contra a doença. Porém, análises experimentais e observações de campo sugerem que a indução de uma imunidade protetora contra a malária possa ser um objetivo tangível. Corroboram para essa hipótese o desenvolvimento de proteção assintomática como resultado da inoculação de esporozoítos irradiados em camundongos (NUSSENZWEIG et al., 1967), em primatas não humanos (COLLINS et al., 1989) e no homem (CLYDE, 1990; EPSTEIN et al., 2011; RIECKMANN et al., 1979).

São diversas as estratégias de vacinação contra a malária, sendo que formulações direcionadas para a fase pré-eritrocítica do ciclo de vida visam gerar anticorpos capazes de neutralizar os esporozoítos e impedi-los de invadir hepatócitos (HOLLINGDALE, 1990). A Proteína Circumsporozoíta (CSP, do inglês *Circumsporozoite Protein*) é o componente majoritário da superfície dos esporozoítos, sendo necessária para o processo de invasão das células hepáticas do hospedeiro humano (MCCUTCHAN et al., 1996; STEWART et al., 1986). Tal

proteína possui 3 regiões claramente definidas: uma extensa região central de aminoácidos em tandem *repeats* espécies-específicos (ARNOT et al., 1985; ARNOT; BARNWELL; STEWART, 1988; HERRINGTON et al., 1987), flanqueada por 2 regiões altamente conservadas, região I N-terminal e a região II C-terminal. Em contraste com a região central de *P. falciparum*, isolados de *P. vivax* apresentam variações alélicas para esta porção. As sequências de aminoácidos GDRA[A/D]GQPA, caracterizam o genótipo clássico VK210 (ARNOT et al., 1985) que com VK247, sequência ANGA[G/D][N/D]QPG (ROSENBERG et al., 1989), são os alelos mais frequentes em comparação ao terceiro genótipo, o *P. vivax-like* (APGANQ[E/G]GGAA) (COCHRANE et al., 1990; GOPINATH et al., 1994; QARI et al., 1991, 1993, 1994). Esta variabilidade alélica é conservada por pressão evolutiva, como mais uma estratégia de escape imune do parasito (GALINSKI et al., 1987), e todas as 3 variantes identificadas possuem distribuição mundial (IMWONG et al., 2005; KAIN et al., 1992; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; STORTI-MELO et al., 2009; ZAKERI et al., 2006).

Baseados na variabilidade alélica de PvCSP, Gimenez e colaboradores (2017) compararam a imunogenicidade de um protocolo de vacinação *prime-boost* homólogo, utilizando como antígenos tanto as variantes alélicas da proteína PvCSP expressadas separadamente e administradas como um mix, como também essas variantes fusionadas como uma única proteína, denominada de yPvCSP-All_{CT}. Em ambos os grupos, foi usado como adjuvante o Poly (I:C). O experimento concluiu que, uma vez que ambas as formulações eram capazes de gerar altos títulos de anticorpos, de longa duração e sem qualquer diferença significativa entre os grupos, a proteína recombinante quimérica yPvCSP-All_{CT} pode ser utilizada em vez das variantes expressas separadamente, o que traz o benefício de produzir, em um único processo, uma vacina que cobre as 3 regiões polimórficas da proteína CS (GIMENEZ et al., 2017).

Posteriormente, essa formulação foi utilizada em um ensaio de desafio, com o objetivo de avaliar seu efeito protetor. Nesse ensaio, o esporozoíto transgênico de *Plasmodium berghei* ANKA, expressando a variante VK210 de *P. vivax*, foi utilizado como um modelo experimental em camundongos. Os resultados obtidos

demonstraram um efeito protetor em 4 dos 6 camundongos submetidos ao experimento, e mesmo nos animais parasitados, foi observado uma parasitemia cerca de 20 vezes menor no fígado, comparado ao grupo controle. Esse ensaio demonstrou que a formulação vacinal possui grande potencial para ser submetido a ensaios pré-clínicos (GIMENEZ et al., 2017).

Em relação ao desenvolvimento de novas formulações vacinais, uma questão extremamente relevante a ser abordada é a sua capacidade de se manter estável até o momento de seu uso. O desenvolvimento de formulações que possam ser armazenadas e permanecer biologicamente ativas até o momento de seu uso, é um desafio a ser superado. Estima-se que metade das vacinas fornecidas se tornam inutilizáveis devido a processos de degradação, o que consequentemente influencia a distribuição desse tipo de produto ao redor do mundo (BRANDAU et al., 2003; CLÉNET, 2018). Além disso, para a condução de estudos clínicos de fase III, a formulação candidata ao licenciamento precisa ter sua estabilidade comprovada, que corroborem de maneira precisa de que a formulação é capaz de ser testada na população. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Apesar de muitos fatores contribuírem para a instabilidade de vacinas, a temperatura é o principal. A forma farmacêutica do produto possui também grande influência em sua estabilidade. Formulações líquidas, principalmente, são mais instáveis, uma vez que reações degradativas ocorrem mais rapidamente em meio aquoso. Produtos liofilizados são, portanto, mais desejáveis, quando aplicável, já que no estado seco há menor mobilidade de água, o que retarda a taxa de reações degradativas. Esse processo é muito vantajoso, principalmente em produtos destinados a serem usados em regiões onde a manutenção da rede de frio é difícil (BRANDAU et al., 2003; CARPENTER; CHANG; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM RANDOLPH, 2002; CHAN; DUTILL; KRAMER, 2017; GONZALES, 2015).

2. OBJETIVO(S)

Expressar e purificar a proteína yPvCSP-AllCT a partir de leveduras *P. pastoris*, e realizar estudo de estabilidade, durante seis meses, da proteína em

questão, potencial candidata à vacina contra malária vivax, em formulações líquida e liofilizadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Sequência da proteína recombinante:

As sequências de nucleotídeos codificando para a proteína recombinante foi sintetizada com otimização de códon para a expressão em *P. pastoris* pela empresa GenScript (GIMENEZ et al., 2017). A proteína yPvCSP-All_{CT} inclui uma cauda de hexa-Histidina para possibilitar a posterior purificação por cromatografia de afinidade em resina de Níquel. Abaixo a sequência da proteína recombinante utilizada neste trabalho (Repetições de VK210 realçado em amarelo, VK247 em verde e *P. vivax*-like em roxo).

yPvCSP-All_{CT}

```
PRENKLKQPGPGDRADGQPAGDRADGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRADGQ
PAGDRADGQPAGDRADAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAAPGA
NQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAANGAGNQPGANGAGNQPGANGAG
NQPGANGAGNQPGANGAGNQPCDRAAGQAAGGNAGGQQQNNEGAPNEKSVK
EYLDKV RATVGTEWTPCSVTCGVGVRVRRRVNAANKPEDTLNDLETDVCTHHHH
HH*
```

3.2 – Expressão das proteínas recombinantes:

A sequência acima descrita está clonada no plasmídeo pPIC9K (Invitrogen), e foi expressa em leveduras *P. pastoris* metilotróficas da linhagem GS115, de acordo com o protocolo preconizado por nosso grupo (DE CAMARGO et al., 2018). A indução foi mantida pela adição diária de metanol na concentração final de 1,0% durante 72-96 horas de incubação. A detecção da proteína foi feita por SDS-PAGE 12%, corada com azul de Coomassie.

3.3 – Purificação da proteína recombinante e diálise em diferentes tampões:

A purificação da proteína recombinante foi realizada em 2 etapas cromatográficas, afinidade e troca iônica. Inicialmente, o sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando uma

coluna de níquel HisTrap™FF (GE Healthcare USA Inc.) acoplada ao sistema FPLC ÄKTA *prime plus* (GE Healthcare USA Inc.). A eluição ocorreu contra um gradiente de imidazol (15-400 mM) em tampão fosfato de sódio (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, 0,5 M, pH=6,0).

As frações contendo a proteína recombinante, identificadas em SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie, foram dialisadas em membrana *SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing* 10.000 MWCO, contra 20 mM Tris-HCl, (pH=8,0). Após a diálise, a proteína foi filtrada (0,45 µm) e submetida a uma etapa de purificação por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna HiTrap™QFF (GE Healthcare USA Inc.), também acoplada ao sistema ÄKTA. A eluição das proteínas ocorreu com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl em relação ao tampão 20 mM Tris-HCl.

A determinação da concentração da proteína foi realizada por análise de predição, através do software ImageQuant™ TL versão 8.1 (GE Healthcare USA Inc.), utilizando como base comparativa uma curva de calibração com concentrações definidas de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*).

Após ambas as purificações, frações contendo a proteína recombinante foram então dialisadas contra 3 diferentes soluções: tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) (8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, pH=7,4); tampão MES (0,1M MES; sacarose a 0,5% (m/v), e manitol a 5% (m/v), em pH=6,2), ou tampão CRIo (solução de PBS, sacarose a 10% (m/v), 0,005% de polisorbato 20, em pH=6,2) *overnight*, com agitação constante a 4°C (LIU; ZHOU, 2015).

Para as formulações em tampão CRIo e MES, a escolha de cada componente foi realizada baseando-se em seu efeito protetor para a proteína quimérica, que posteriormente foi submetida ao processo de liofilização. O PBS e o MES são agentes tamponantes, a sacarose, presente nos tampões CRIo e MES, é um componente estabilizador, importante para a manutenção da conformação da proteína, e também para mimetizar as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e da proteína, quando esta se encontra em meio aquoso (LIU; ZHOU, 2015). Já o manitol, presente no tampão MES, é um poliol, assim como a sacarose, mas

diferente dela é capaz de agir como agente de corpo, permitindo a fixação dos componentes na pastilha de liofilização (LIU; ZHOU, 2015). O polissorbato 20, presente no tampão CRIO, é usado como surfactante, e consegue reduzir a tensão superficial causada pelo processo de liofilização. Também age como agente molhante durante a reconstituição (LIU; ZHOU, 2015).

3.4 – Processo de liofilização:

As amostras em tampão CRIO e MES foram submetidas ao processo de liofilização, realizado de acordo com o preconizado por Bexiga e colaboradores (BEXIGA et al., 2018). As amostras foram primeiramente congeladas a -40°C por 30 minutos, a uma taxa de 2,5 °C/min. A secagem primária foi realizada a -35°C por 5 horas, sub pressão de 100mT, e a secagem secundária, a 15°C por mais 4 horas, sob a mesma condição de pressão. Posteriormente, a temperatura foi ajustada para 2°C sub pressão de 20mT, e estas condições foram mantidas por mais 2 horas. Os frascos foram então fechados sob vácuo, que foi posteriormente interrompido com a injeção de gás nitrogênio.

3.5 – Temperaturas de armazenamento e pontos de análise do estudo de estabilidade:

As amostras, formuladas em tampões PBS, CRIO e MES foram mantidas sob 3 diferentes condições de temperatura, baseado no preconizado pela RDC 412 da ANVISA e pelo CIH Q5C do EMEA (do inglês *European Medicines Agency*) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1996) A tabela abaixo descreve todas as condições de temperatura do estudo de estabilidade:

Tabela 1: formulação e condições de armazenamento de amostras submetidas ao estudo de estabilidade

Temperaturas		
-20°C ($\pm 2^\circ$)	5°C ($\pm 3^\circ$)	25°C ($\pm 3^\circ$)
G1-1 yPvCSP-All _{CT} Liofilizado em tampão MES	G2-1 yPvCSP-All _{CT} Liofilizado em tampão MES	G3-1 yPvCSP-All _{CT} Liofilizado em tampão MES
G1-2 yPvCSP-All _{CT} Liofilizado em tampão CRIO	G2-2 yPvCSP-All _{CT} Liofilizado em tampão CRIO	G3-2 yPvCSP-All _{CT} Liofilizado em tampão CRIO
G1-3 yPvCSP-All _{CT} Líquido em tampão PBS	G2-3 yPvCSP-All _{CT} Líquido em tampão PBS	G3-3 yPvCSP-All _{CT} Líquido em tampão PBS

O estudo de estabilidade foi realizado por 180 dias, com 6 pontos de análise, como mostra a figura abaixo. As metodologias de cada um dos testes realizados são descritas abaixo.

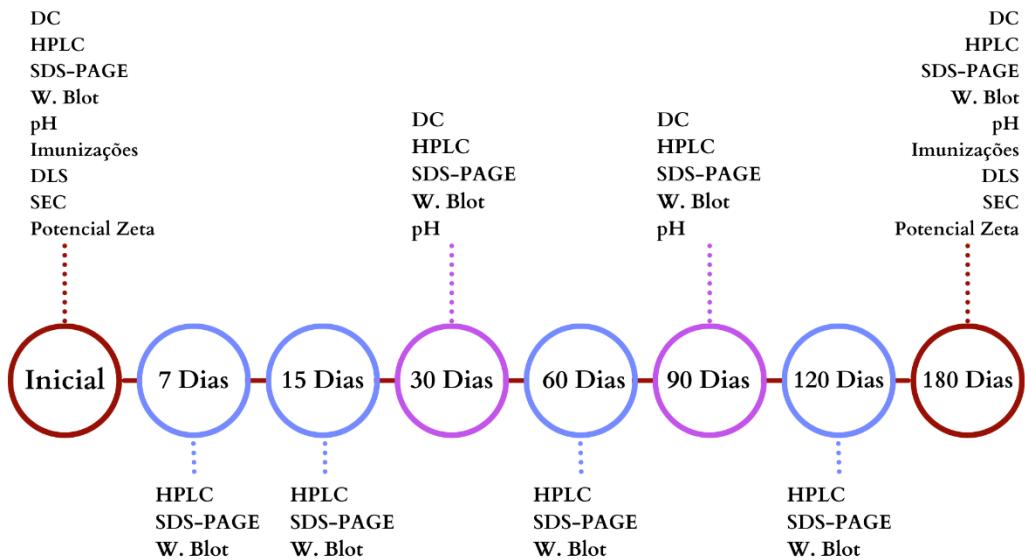


Figura 1: Pontos de análise e ensaios realizados durante o estudo de estabilidade, com duração de 180 dias

3.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE):

As eletroforeses foram realizadas a 120V em solução tampão de tris-glicina (SDS a 35 mM glicina a 160 mM, Tris-HCl a 25 mM), usando géis prontos para

proteínas Mini-PROTEAN TGX Precast, (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Os géis foram corados com solução corante (Coomassie blue R250 a 1% (m/v), metanol a 45% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v)). As amostras foram preparadas com tampão de amostra (concentração final: 2,5% (m/v) de glicerol, 4% (m/v) de SDS, 25 mM de 2-mercaptopropano, 12,5 mM de Tris-HCl e 0,025 mM de azul de bromofenol), e aquecidas a 97°C por 2 minutos.

3.7 – Western blot:

As amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE conforme descrito anteriormente, e posteriormente foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hybond N (GE Healthcare USA Inc.) em tampão de transferência (160 mM glicina, 25 mM Tris e 20% (v/v) metanol) a 90 V por 30 minutos, utilizando o sistema de transferência semiúmida Bio-Rad. As membranas foram, em seguida, incubadas por 16-18 horas, 4°C, em solução de bloqueio (5% (m/v) de leite em pó desnatado e 2,5% (m/v) de BSA em PBS).

Após este período, as membranas foram incubadas por 1 hora a T.A., com o anticorpo policlonal anti- γ PvCSP-Allct (v/v) diluição de 1:2.000, sob condições reduzidas. Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS-T [0,05% Tween 20, (v/v)], as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase diluído 1:3.000 em solução de bloqueio por 1 hora a T.A. Após 3 lavagens com PBS-T, a revelação por quimioluminescência, utilizando kit ECL *Western Blotting Analyses System* (GE Healthcare USA Inc.) foi realizada.

3.8 – Dicroísmo circular:

Os testes de dicroísmo circular (DC) foram realizados em espectropolarímetro JASCO-J810 (Jasco ITA Corp., Milano, MI), equipado com um sistema de controle de temperatura contínuo, na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram lidas em cubetas de quartzo de 2mm de caminho óptico, e submetidas a 5 scans UV realizados na velocidade de 20nm/min, entre os comprimentos de onde de 260-190 nm com 1 nm de *bandwidth* para respostas de 1 segundo a 20°C. Os espectros foram corrigidos

através da subtração do sinal do tampão (PBS, Crio ou MES), e a elipiticidade molar residual foi calculada para análise das estruturas secundárias da proteína recombinante utilizando o BeStSel (MICSONAI et al., 2015, 2018).

3.9 – Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC):

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna C4 Vydac (4,6 mm × 250 mm, para partículas de 300 Hm) em um sistema HPLC Shimadzu LC Solution. O procedimento foi realizado no departamento de análises clínicas e toxicológicas da FCF/USP no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas. Foi utilizado para eluição um gradiente de acetonitrila de 0-100% em 0,1% de ácido trifluoracético / 90% acetonitrila a aproximadamente 24°C, sob um fluxo de 1 mL/minuto por 40 minutos. A eluição foi monitorada com um detector de absorbância UV-visível (Shimadzu SPD M20A, Shimadzu JPN Corp.) a 214 nm (JIMENEZ et al., 2008).

3.10 – Estudo de imunogenicidade em camundongos:

Camundongos fêmeas C57BL/6, de 6 a 8 semanas de vida, foram imunizados s.c. com 10 µg da proteína recombinante/dose/animal, em 2 protocolos, de acordo com as tabelas abaixo. A imunização ocorreu em 3 doses, espaçadas entre elas em 14 dias. 13 dias após cada imunização, os soros dos camundongos foram coletados e posteriormente analisados por ELISA. Estes protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da FCF-USP (CEUA/FCF 048.2020-P599). Para o protocolo 1, as amostras com a proteína recém expressa, purificada e liofilizada, quando aplicado, foram inicialmente acondicionadas em suas temperaturas de armazenamento correspondentes, um dia antes do início das imunizações. Durante cada uma das doses, as alíquotas foram mantidas em sua temperatura de armazenamento correspondente. Para o protocolo 2, as amostras permaneceram mantidas em suas condições de temperatura por 180 dias antes do início das análises, assim como posteriormente, durante cada uma das doses.

Tabela 2: Esquema de imunização dos camundongos para o estudo de estabilidade

Grupos	Protocolo 1	Protocolo 2	Nº de animais	Dose/Animal Prot+Adj
	Prime e Boost (2x)	Prime e Boost (2x)		
1	Poly (I:C) + PBS	Poly (I:C) + PBS	5	50 µg
2	Poly (I:C) + CRIOD	Poly (I:C) + CRIOD	5	50 µg
3	Poly (I:C) + MES	Poly (I:C) + MES	5	50 µg
4	yPvCSP-All _{CT} tampão PBS a -20° C + Poly (I:C)	yPvCSP-All _{CT} tampão PBS a -20° C + Poly (I:C)	5	10 µg + 50 µg
5	yPvCSP-All _{CT} tampão PBS a 5° C + Poly (I:C)	yPvCSP-All _{CT} tampão CRIOD a -20° C + Poly (I:C)	5	10 µg + 50 µg
6	yPvCSP-All _{CT} tampão PBS a 25° C + Poly (I:C)	yPvCSP-All _{CT} tampão CRIOD a 5° C + Poly (I:C)	5	10 µg + 50 µg
7	yPvCSP-All _{CT} tampão CRIOD a -20° C + Poly (I:C)	yPvCSP-All _{CT} tampão CRIOD a 25° C + Poly (I:C)	5	10 µg + 50 µg
8	yPvCSP-All _{CT} tampão CRIOD a 5° C + Poly (I:C)	yPvCSP-All _{CT} tampão MES a -20° C + Poly (I:C)	5	10 µg + 50 µg
9	yPvCSP-All _{CT} tampão CRIOD a 25° C + Poly (I:C)	yPvCSP-All _{CT} tampão MES a 5° C + Poly (I:C)	5	10 µg + 50 µg
10	yPvCSP-All _{CT} tampão MES a -20° C + Poly (I:C)	yPvCSP-All _{CT} tampão MES a 25° C + Poly (I:C)	5	10 µg + 50 µg
11	yPvCSP-All _{CT} tampão MES a 5° C + Poly (I:C)	---	---	---
12	yPvCSP-All _{CT} tampão MES a 25° C + Poly (I:C)	---	---	---

3.11 – Análise de anticorpos por ELISA:

Os soros coletados após cada uma das três doses, através da veia submandibular dos camundongos ($n=5$ por grupo), foram analisados quanto a presença de anticorpos contra a proteína yPvCSP-All_{CT}, assim como quanto a presença de anticorpos contra cada uma das variantes alélicas da proteína quimérica, e contra sua região C-terminal, através do teste imunoenzimático ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), como previamente descrito (TEIXEIRA et al., 2014). As proteínas recombinantes mencionadas foram utilizadas como antígeno alvo, a 200ng por poço. Após incubação overnight TA, as placas foram lavadas com solução de PBS e 0,05% de polissorbato 20% (PBS-T), e

bloqueadas com solução de bloqueio (PBS, 5% (m/v) de leite desnatado) por duas horas a 37°C. Diluições seriadas, iniciando-se com 1:200 do soro murino foram adicionadas nos poços e incubados por 1 hora a TA. Após a lavagem das placas com PBS-T, o anticorpo secundário anti IgG murino ligado a peroxidase (Sigma, St. Louis, USA) foi adicionado em casa poço numa diluição de 1:3.000. O Sistema OPD/ácido de parada foi utilizado para determinar os títulos anti-PvCSP baseado na maior diluição do soro que produziu um valor de absorbância a 492 nm superior a 0,1 (GIMENEZ et al., 2017).

3.12 – Determinação do pH:

Para determinação do pH das amostras submetidas ao estudo de estabilidade, foram utilizados papeis indicadores universais, com escala de 0 a 14 (MColorpHast, Merck, MA, USA). Cerca de 1mL de cada amostra foi utilizado para determinação do pH.

3.13 – Análise estatística:

Análise de variância (*One-way ANOVA*) e o teste de Turkey HSD (do inglês *honestly significant difference*) foram utilizados para comparar os resultados dos diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 – Análise visual das amostras:

Em geral, como pode ser visto na figura 2a e 2b, as amostras liofilizadas apresentaram pastilhas de liofilização dentro das especificações preconizadas por Patel e colaboradores (2017), ou seja, as pastilhas podem ser classificadas como uniformes (PATEL et al., 2017). As amostras liofilizadas em tampão CRYO, quando mantidas a 25°C a mais de sete dias, apresentaram a aparência mostrada na figura 2c. Nessas amostras, o tempo de reconstituição do produto foi maior, porém não foram observadas outras mudanças na estabilidade da proteína, quando

comparamos com os resultados observados para as amostras liofilizadas que apresentaram as pastilhas dentro das especificações.

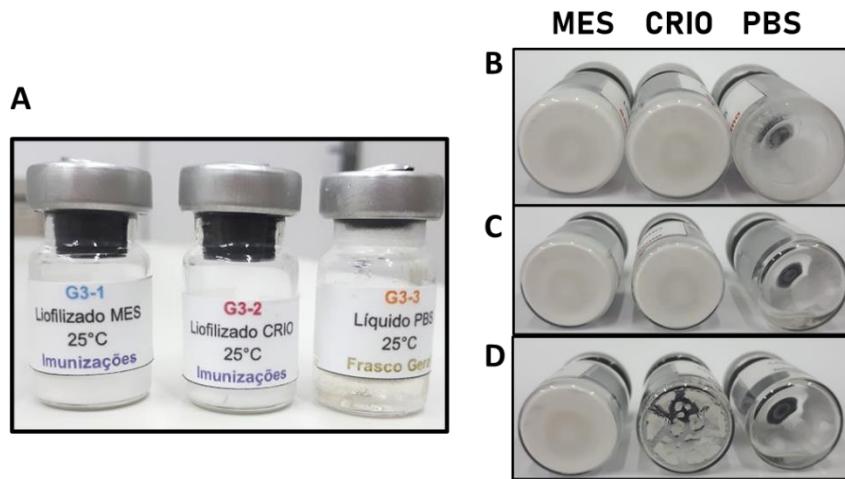


Figura 2: Imagens representativas das amostras submetidas ao estudo de estabilidade. Amostras formuladas em tampão PBS, Crio e MES no tempo inicial (**A**) e no dia 180 após o início do estudo, armazenados a **B** – -20°C, **C** – 5°C e **D** – 25°C

4.2 – Identidade da proteína:

Os ensaios de SDS-PAGE e *western blot* foram realizados com o objetivo de identificar a presença da proteína recombinante durante o estudo de estabilidade. Como pode ser visto na figura 3a abaixo, no tempo inicial, a proteína yPvCSP-All_{CT} está presente em todas as amostras, enquanto que no tempo final, 180 dias após o início do estudo, das amostras formuladas em tampão PBS, apenas aquela mantida a -20°C apresentou a proteína inalterada, como visto na figura 3b. Para as amostras liofilizadas em tampão Crio e MES, a proteína se mantém inalterada até o tempo final, quando armazenadas a -20°C e 5°C. Todavia é possível observar, através do ensaio de *western blot*, algumas bandas de degradação para as amostras mantidas a 25°C, mas tais bandas não são visíveis no gel de SDS-PAGE, e são menos intensas do que aquela correspondente a proteína químérica.

Para uma análise mais específica da condição da proteína, principalmente considerando os possíveis danos sofridos devido ao processo de liofilização, um ensaio de cromatografia por exclusão molecular foi realizado, como visto a figura 3c. Ambas as formulações liofilizadas foram capazes de manter a integridade da proteína, já que os três chromatograms apresentam um pico principal no mesmo

tempo de retenção. Para as amostras liofilizadas, foi possível detectar dois outros picos, após o principal, que pode corresponder a produtos de degradação de tamanhos inferiores. Outro pico, que aparece anterior ao pico principal, é observado nos cromatogramas das amostras liofilizadas, o que pode indicar um possível processo de agregação. Esses dois últimos resultados não foram observados nas análises por SDS-PAGE nem *western blot*.

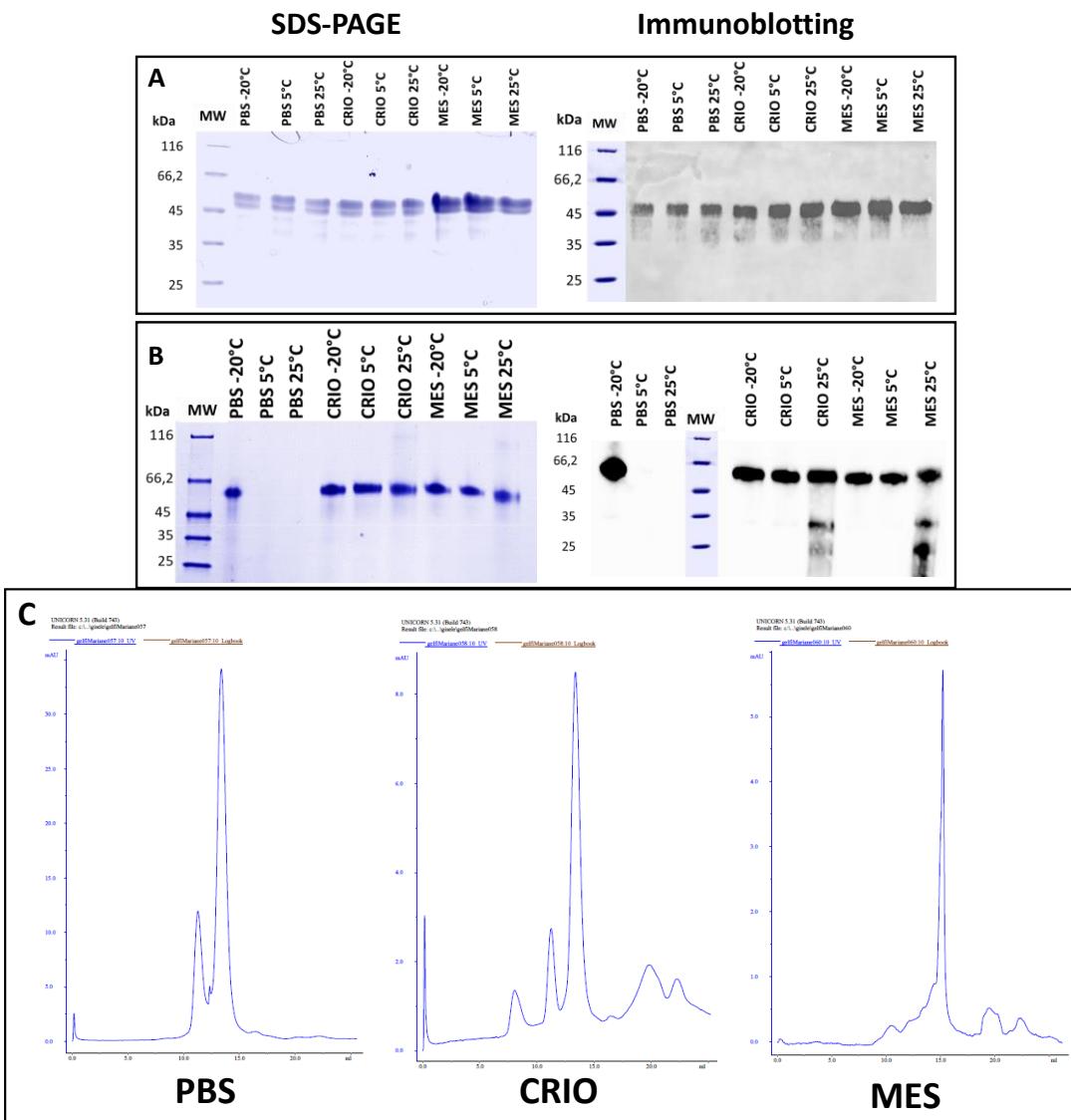


Figura 3 - Análise de SDS-PAGE e western blot da proteína yPvCSP-All_{CT} formuladas em tampões PBS, CRIOD ou MES, mantidas a -20°C, 5°C ou 25°C. A análise de SDS-PAGE foi feita sob condições redutoras com peso molecular em kDa, utilizando cerca de 1,5µg de cada amostra. Os ensaios de western blot foram realizados contra anticorpos policlonais anti-yPvCSP-All_{CT}, utilizando 0,5µg de cada amostra. **A** – Análises do tempo inicial das amostras do estudo de estabilidade; **B** – Análises das amostras após 180 dias do início do estudo; **C** – Cromatogramas da análise por SEC, para a proteína em cada formulação.

4.3 – Caracterização por Dicroísmo Circular:

O ensaio de dicroísmo circular foi realizado com os objetivos de determinar se a liofilização da proteína recombinante e sua interação com os excipientes utilizados nesse processo causaram qualquer modificação na estrutura secundária da mesma, assim como monitorar a situação conformacional da yPvCSPAll-_{CT} ao decorrer do tempo e em diferentes condições de armazenamento. A partir da deconvolução dos espectros gerados nas leituras das análises, que foi realizada utilizando o software BeStSel, é possível estimar a porcentagem correspondente a cada tipo de estrutura secundária presente na proteína, e para melhor compreender os resultados obtidos, gráficos comparando as porcentagens de cada estrutura da proteína em cada formulação durante o tempo é visto na figura 4 e na tabela em anexo (anexo 2).

Após a deconvolução dos espectros, foram encontrados 4 tipos de estruturas na proteína em estudo: α-hélices, folhas-β antiparalelas e voltas-β, três tipos de estruturas secundárias estáveis e bem definidas, além de estruturas randômicas, menos estáveis quando comparadas as outras três. Para estruturas em α-hélice (figura 4a), amostras em tampão PBS e MES apresentam baixas porcentagens, mas as formulações em tampão CRIO, em todas as condições de temperatura, mostraram aumento na porcentagem dessa estrutura com o passar do tempo até o dia 90, e um declínio no tempo final. Para estruturas em folhas-β antiparalelas (figura 4b), as formulações em tampão MES apresentaram aumento das porcentagens durante o tempo, mas as formulações em tampão CRIO apresentou perda dessa estrutura no tempo final, alcançando porcentagem semelhante a observada pela amostra em tampão PBS armazenada a -20°C, considerada nesse experimento como amostra padrão.

Para as estruturas em voltas-β, as formulações em tampão MES apresentaram altas porcentagens, enquanto as formuladas em tampão CRIO apresentaram baixas porcentagens, quando comparadas a amostra em PBS. Para as estruturas randômicas, nas amostras em tampão CRIO, a porcentagem decai durante o tempo até o dia 90, mas atinge sua maior porcentagem no tempo final, com porcentagens similares as observadas para a amostra padrão. Para as

amostras formuladas em tampão MES, entre os dias 0 e 30, há um aumento de estruturas randômicas na proteína, porém entre os dias 30 e 180, a porcentagem cai gradualmente até chegar a 0% no tempo final.

Para todas as estruturas analisadas, as porcentagens para a amostra em PBS a -20°C permanecem constantes durante todo o tempo. Aquelas formuladas em PBS e armazenadas a 5 e 25°C não apresentaram qualquer estrutura a partir do dia 30, devido a degradação da proteína que ocorre quando a mesma é mantida a essas condições de temperatura. Nota-se, portanto, que as formulações liofilizadas apresentam conformações proteicas mais estáveis do que a amostra padrão, porém apenas a formulação em tampão MES consegue manter tais estruturas ao decorrer dos seis meses de análise.

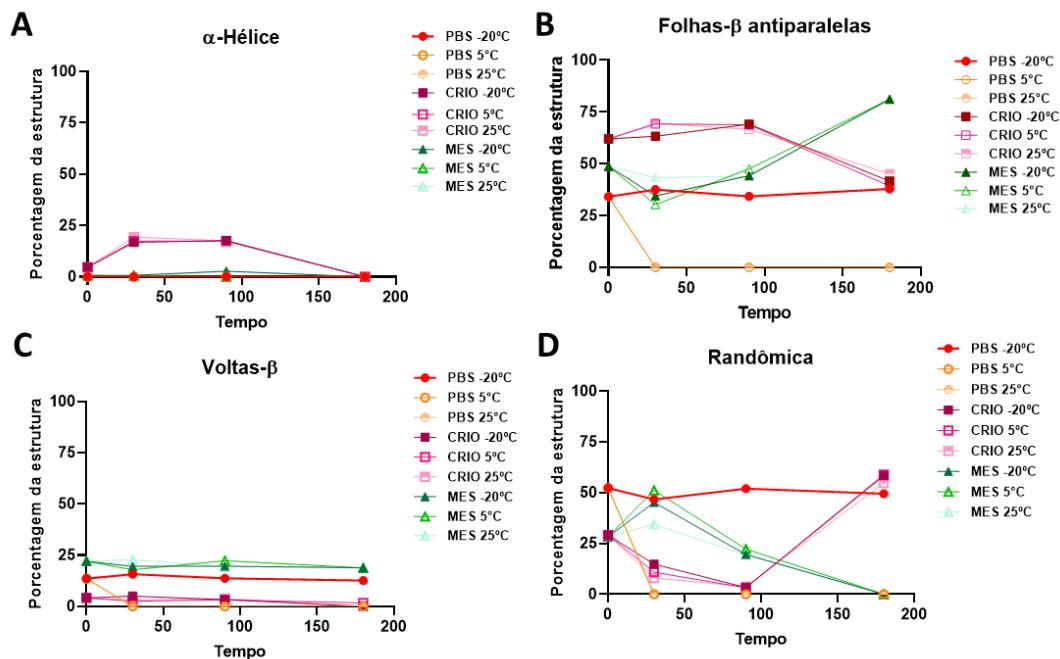


Figura 4 – Porcentagem de estruturas secundárias de cada amostra submetida ao estudo de estabilidade. A – Porcentagem de α-hélice; B – porcentagem de folhas-β antiparalela; C – porcentagem de voltas-β; D – porcentagem de estruturas randômicas. A predição de estruturas foi calculada através do software BeStSel, a partir dos dados obtidos nas análises por dicroísmo circular.

4.4 – Pureza por RP-HPLC:

Amostras no tempo inicial, formuladas em tampão PBS, Crio ou MES foram avaliadas por HPLC, como mostra a figura 5 abaixo. O processo de liofilização não causou qualquer mudança na pureza das amostras testadas.

Comparando o cromatograma das amostras em PBS no tempo inicial com as amostras formuladas no mesmo tampão no tempo final, quando armazenadas nas três diferentes condições de temperaturas utilizadas neste estudo (figura 5a), apenas as amostras mantidas a -20°C apresentou cromatograma comparável ao do tempo inicial. Nas outras duas amostras, é possível notar certa degradação da proteína analisada, devido ao aparecimento de outros picos e a redução do pico majoritário, com tempo de retenção (RT) igual a 7,5 min, sinal derivado da proteína inteira.

Para as amostras liofilizadas (figuras 5b e 5c), todos os cromatogramas do tempo final são comparáveis aos cromatogramas do tempo inicial de sua respectiva formulação, apresentando um pico majoritário com RT de 7,5 min, e sem quaisquer picos secundários.

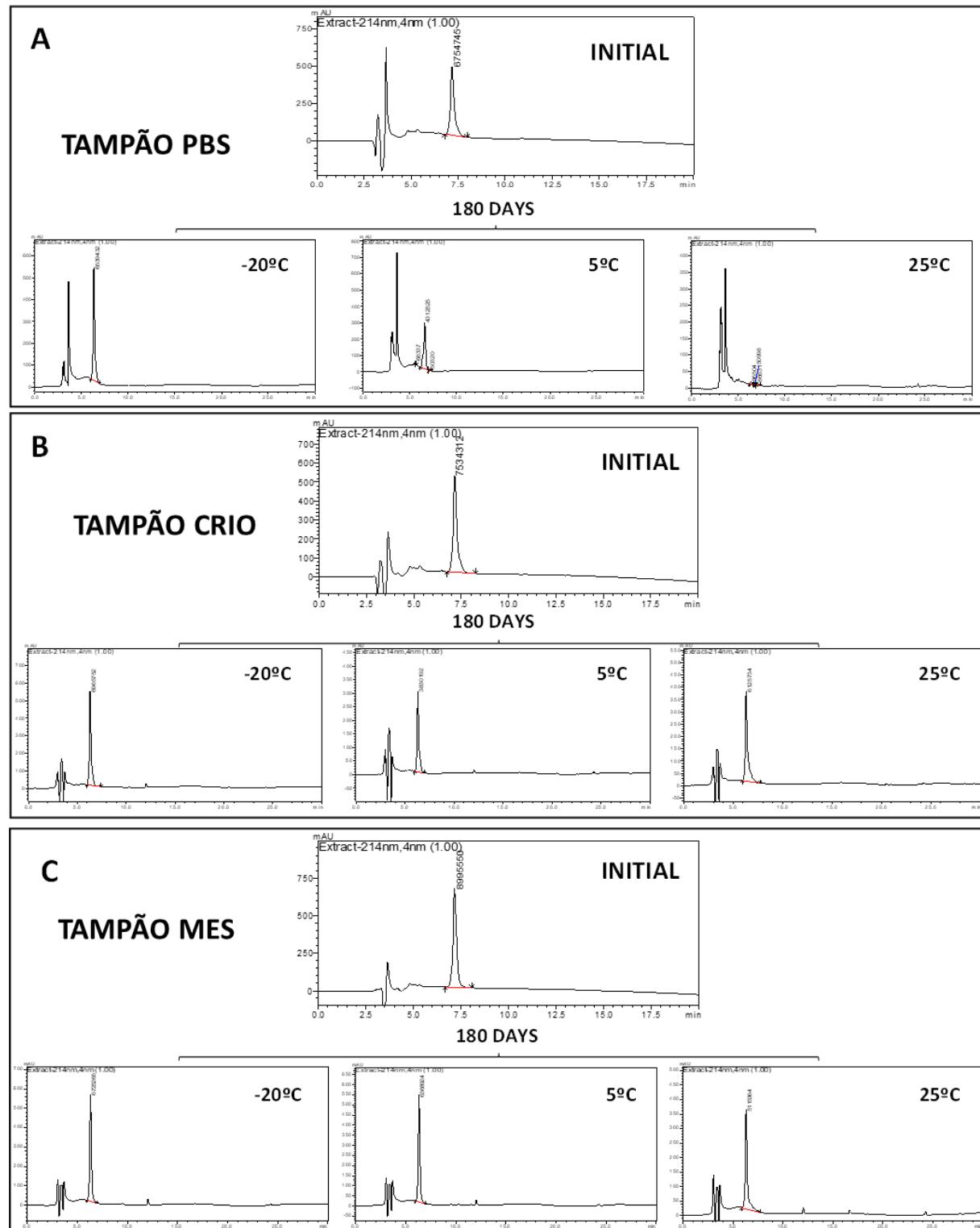


Figura 5 – Cromatogramas obtidos após análise por RP-HPLC. Análise das amostras formuladas em **A** – tampão PBS; **B** – tampão CRIÓ e **C** – tampão MES, nos tempos inicial e final (180 dias), este último em cada uma das condições de temperatura do estudo. O gradiente de eluição foi estabelecido pela combinação de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água e 0,1% de TFA em 90% de acetonitrila a 24°C, em fluxo de 1 mL/min por 40 min, em uma coluna C18.

4.5 – Análise do pH das amostras:

Os resultados são mostrados na tabela resumo. Tanto as amostras formuladas em tampão PBS quanto as formuladas em tampão CRIOD apresentaram valores de pH esperados, mas as amostras formuladas em tampão MES mostrou-se mais ácida do que o previsto. Apesar disso, o pH de todas as amostras permanecera estáveis durante todo o tempo de estudo.

4.6 – Imunoensaios:

Para o primeiro protocolo, os títulos de anticorpos obtidos após a terceira dose para cada uma das formulações, que foram mantidas em cada uma das temperaturas de análise, -20°C, 5°C e 25°C, são vistos na figura 6^a abaixo.

Para as amostras liofilizadas em tampão MES, não houve qualquer diferença significativa ($P > 0,05$) entre as amostras armazenadas em diferentes temperaturas, mas ao comparar as amostras formuladas em tampão CRIOD armazenadas a -20°C e 5°C, assim como a -20°C e a 25°C, houve diferenças significativas ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente). Apesar disto, os títulos de anticorpos dessas amostras são comparáveis com o observado para a amostra mantida a -20°C e formulada em PBS, considerada nesse estudo como a amostra padrão.

Para as amostras formuladas em PBS e mantidas a 5°C e a 25°C, houve uma redução significativa ($P < 0,001$ e $P < 0,0001$) dos títulos de anticorpos quando comparados a amostra padrão. Quando comparadas as três amostras armazenadas a 25°C, aquela formulada em tampão PBS mostrou possuir títulos de anticorpos significativamente mais baixos do que aqueles observados para a amostra liofilizada em tampão MES ($P < 0,05$).

Para o segundo protocolo, como visto na figura 6b, todas as amostras testadas geraram altos títulos de anticorpos, comparáveis com a amostra em tampão PBS mantida a -20°C, também considerada nesse teste como amostra padrão. Para esse ensaio, não foram realizadas as imunizações de animais com as formulações em PBS mantidas por 180 dias a temperaturas de 5°C e 25°C, devido aos outros resultados apresentados acima, que demonstraram que não havia

qualquer quantidade viável de proteína que justificaria o uso de mais animais para a realização dessas imunizações.

Durante as imunizações, devido as diferenças de pH observadas nas amostras liofilizadas em tampão MES, a análise dos animais quanto a possíveis efeitos cutâneos e perda de peso após a imunização foi realizada. Não foi observado qualquer efeito discrepante entre os grupos imunizados com as amostras liofilizadas quando comparados ao grupo imunizado com a amostra em PBS, como visto na tabela resumo.

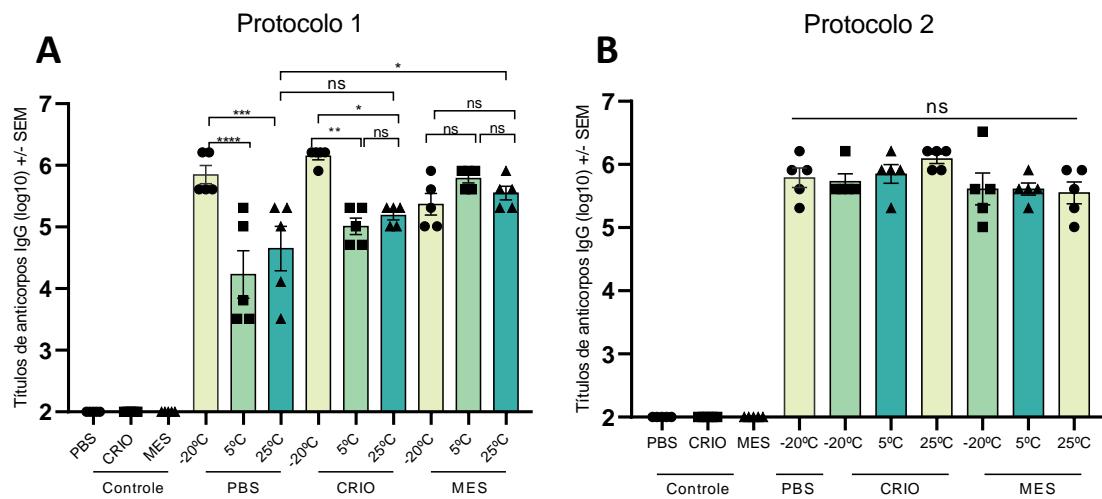


Figura 6 – Resposta de anticorpos específicos (IgG) em camundongos imunizados com a proteína γ PvCSP-All_{CT}, formuladas em diferentes tampões e armazenadas em diferentes condições de temperatura. Camundongos C57BL/6 foram imunizados s.c. com três doses, com 14 dias de intervalo entre cada dose de proteína (10 μ g/dose), na presença do adjuvante Poly (I:C), de acordo com o esquema já mostrado. **A** – Resultados obtidos após a terceira dose, durante o primeiro protocolo de imunizações; **B** – resultados obtidos após a terceira dose durante o segundo protocolo de imunizações. Todos os resultados são apresentados como a média aritmética dos títulos de cada grupo em ($\log_{10} \pm$ SEM) e foram comparados estatisticamente usando One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Turkey. Diferenças entre os grupos são mostradas no gráfico, onde: ns= não significativo, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ e **** $P<0,0001$.

Abaixo, encontra-se uma tabela sumarizando todos os resultados obtidos nos dias 0, 90 e 180 do estudo de estabilidade, assim como seus critérios de aceitação.

Parâmetros		Aparência do produto liofilizado	Identidade por SDS-PAGE	Identidade por western blot	Pureza por RP-HPLC	Caracterização por DC	pH	Análise visual dos camundongos através do teste de Draize		Imunizações
Especificações		Pastilhas brancas e incorruptíveis	Uma banda majoritária entre 66,2 e 45 kDa	Uma banda majoritária entre 66,2 e 45 kDa	Um único pico entre 6 e 7min	Comparável a amostra padrão	Entre 6 e 7	Edema mínimo (1)* a moderado (3)*, com resolução em 5 dias	Eritema mínimo (1)* com resolução em 5 dias	Nenhuma diferença significativa quando comparado a amostra padrão
TEMPO INICIAL	PBS	-20°C	---	Conforme	Conforme	Padrão	6	3	1	STRD
		5°C	---	Conforme	Conforme	---	6	3	1	Não conforme
		25°C		Conforme	Conforme	---	6	3	1	Não conforme
	CRCIO	-20°C	Conforme	Conforme	Conforme	Padrão	6	3	1	Conforme
		5°C	Conforme	Conforme	Conforme	---	6	3	1	Conforme
		25°C	Conforme	Conforme	Conforme	---	6	3	1	Conforme
	MES	-20°C	Conforme	Conforme	Conforme	Padrão	4	3	1	Conforme
		5°C	Conforme	Conforme	Conforme	---	4	3	1	Conforme
		25°C	Conforme	Conforme	Conforme	---	4	3	1	Conforme
TEMPO FINAL	PBS	-20°C	---	Conforme	Conforme	Conforme	6	3	1	Padrão
		5°C	---	Não conforme	Não conforme	Conforme	6	3	1	---
		25°C	---	Não conforme	Não conforme	Não conforme	7	3	1	---
	CRCIO	-20°C	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	6	3	1	Conforme
		5°C	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	6	3	1	Conforme
		25°C	Não conforme	Conforme	Não conforme	Conforme	6	3	1	Conforme
	MES	-20°C	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	4	3	1	Conforme
		5°C	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	4	3	1	Conforme
		25°C	Conforme	Conforme	Não conforme	Conforme	4	3	1	Conforme

--- - Análise não realizada

* - De acordo com a escala de Draize

5. DISCUSSÃO

A rede de frio ou cadeia de frio pode ser compreendida como o processo que garante o recebimento, transporte, armazenamento, conservação e distribuição de imunobiológicos em condições de temperaturas ideais, que deve ser mantida desde sua produção até chegar as salas de vacinas, conhecidas como instância final da RF (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019; RAGLIONE et al., 2016). Essa estrutura é coordenada, aqui no Brasil, pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), e por via de regra, a conservação desse tipo de produto ideal é de 2ºC a 8ºC (SANTOS, 2017). Sabe-se que os casos de malária ocorrem principalmente na região da Amazônia Legal, em locais onde o acesso ao sistema de saúde é mais difícil e precário, além de ser uma região conhecida pelas altas taxas de umidade e temperatura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Pensando nisso, um imunizante que se destina justamente a essa região, aqui no Brasil, e a regiões de características similares ao redor do globo, precisa possuir ótimas características de estabilidade frente a altas temperaturas e grandes períodos de armazenamento.

Vacinas baseadas em proteínas recombinantes estão ganhando mais importância a cada ano, mas a baixa estabilidade desse tipo de produto, principalmente quando em formulações líquidas, traz ao desenvolvimento de vacinas vários desafios (LIU; ZHOU, 2015). Devido a isso, formulações sólidas, como as liofilizadas, são mais recomendadas, já que produtos facilmente lábeis, quando possuem seu conteúdo de água reduzido ou até mesmo eliminado, tornam-se mais estáveis, uma vez que reações degradativas costumam acontecer em meio aquoso. A liofilização, portanto, permite a retirada quase total da água do sistema, sem que seja necessário o alcance de altas temperaturas, como numa secagem tradicional, que não seriam suportadas pelo produto biológico em questão. Além disso, produtos liofilizados podem ser armazenados a temperaturas mais altas do que soluções líquidas, o que facilita todo o processo de logística que, para produtos congelados, torna-se mais caro e, em alguns casos, inviável (ADAMS; COOK; WARD, 2015; CARPENTER; CHANG; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM

RANDOLPH, 2002; CHAN; DUTILL; KRAMER, 2017; LIU; ZHOU, 2015; SANTOS, 2017).

A estratégia de liofilização é utilizada em diversos tipos vacinais, inclusive em imunizantes baseados em proteínas recombinantes. Um exemplo é a vacina contra malária causada por *Plasmodium falciparum*, RTS/S, da farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK), atualmente recomendada pela OMS para aplicação em larga escala (HIERRO, 2021). Durante os testes clínicos da vacina, a mesma foi administrada em um sistema de dois frascos, um contendo o antígeno liofilizado e o outro com o adjuvante AS01 em solução. Tal vacina é armazenada a temperaturas de 2°C a 8°C, e a formulação liofilizada, comparada a líquida, possuem perfis de eficácia e segurança semelhantes (KESTER et al., 2007).

Apesar de a liofilização ser considerado um bom método de secagem, cada etapa pode gerar diferentes tipos de estresse na proteína submetida ao processo, e devido a isso, o uso de substâncias protetoras é indispensável (ADAMS, 2003; ADAMS; COOK; WARD, 2015). A escolha das substâncias protetoras foi um dos pontos críticos desse projeto; sabendo-se que é sempre preferível a escolha de excipientes que já são atualmente liberados para o uso parenteral (CARPENTER; CHANG; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM RANDOLPH, 2002; CHAN; DUTILL; KRAMER, 2017), escolhemos a sacarose como agente estabilizante, o manitol como agente de coro, e o polissorbato 80 como surfactante (LIU; ZHOU, 2015).

Ainda que os avanços observados no campo da liofilização de produtos na indústria farmacêutica sejam incontestáveis, a definição dos atributos de qualidade de uma formulação liofilizada, principalmente sobre sua aparência, permanece vago. Muitas expectativas sobre as características do produto são criadas e, segundo Patel e colaboradores (2017), a aparência ideal de uma pastilha de liofilização é definida como elegante, com cor e textura uniformes (PATEL et al., 2017). Por mais que uma mudança na aparência na pastilha de liofilização possa significar alterações na qualidade do produto, o que pode afetar inclusive os padrões de segurança e eficácia do mesmo, isso nem sempre é observado (PATEL et al., 2017). Neste trabalho, mesmo nas formulações vacinais com pastilhas de liofilização com aparência discrepantes com as ditas ideais, não foram observados

qualquer mudança de potência ou desnaturação da proteína recombinante durante os seis meses de testes.

Essas mudanças nas pastilhas de liofilização observadas neste estudo, em comparação com a definição de pastilha elegante, são classificadas como pastilhas colapsadas, e apenas as amostras formuladas em tampão CRIO, quando armazenadas a 25°C, mostraram essa não conformidade. Muito possivelmente essa formulação possui baixa temperatura de transição vítreia (T_g) e, consequentemente, baixa temperatura de colapso (T_c). A temperatura de transição vítreia de uma certa mistura pode ser definida como aquela onde uma mudança de viscosidade é observada no sistema, mas na qual a extensão do colapso é mínima; já a temperatura de colapso pode ser definida como a temperatura onde o colapso da pastilha é suficiente para causar mudanças na qualidade do produto. Quando uma formulação é liofilizada ou armazenada, após a liofilização, a temperaturas acima da T_g ou da T_c , tais efeitos podem ser observados (ADAMS, 2003; BEXIGA et al., 2018; CARPENTER; CHANG; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM RANDOLPH, 2002; LIU; ZHOU, 2015; Ó'FÁGÁIN; COLLITON, 2017; PATEL et al., 2017). No caso observado durante nosso estudo de estabilidade, acredita-se que a temperatura de armazenamento foi a que influenciou o colapso, já que todas as outras alíquotas formuladas em tampão CRIO foram liofilizadas sob as mesmas condições, e tal colapso não foi observado para as amostras armazenadas a temperaturas mais baixas.

Amostras colapsadas estão em um estado embrorrachado, com fluxo viscoso e, portanto, sujeitas a reações deletérias. Tais produtos apresentam tempo de reconstituição mais altos e maiores níveis de umidade residual (Ó'FÁGÁIN; COLLITON, 2017). Nenhuma reação deletéria ou baixa potência da proteína foi observada nas amostras em CRIO armazenadas a 25°C, mas esta formulação possui maior tempo de reconstituição. Portanto, apesar de que tal colapso possa ser considerado apenas como cosmético, a formulação precisa ser melhorada, considerando que em temperaturas mais altas, como as encontradas em locais onde a malária é uma doença endêmica, algumas reações de degradação podem ocorrer.

Outra condição que pode causar mudanças na qualidade do produto é o pH. É muito comum que mudanças neste parâmetro ocorram durante a liofilização, principalmente devido a efeitos da concentração da solução e cristalização dos componentes da mistura (Ó'FÁGÁIN; COLLITON, 2017). Mudanças no pH em produtos liofilizados é uma condição de estresse, e pode ser deletéria em formulações proteicas, levando até mesmo a desnaturação em alguns casos (CARPENTER; CHANG; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM RANDOLPH, 2002). Surpreendentemente, amostras liofilizadas em tampão CRIO não apresentaram grandes alterações do pH após o processo, mesmo com o uso do PBS como solução tamponante. Como encontrado na literatura, fosfatos podem cristalizar durante a liofilização, diminuindo sua porção disponível em solução para efetivo efeito tamponante, e levando a mudanças no pH (CARPENTER; CHANG; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM RANDOLPH, 2002; CHAN; DUTILL; KRAMER, 2017; LIU; ZHOU, 2015; Ó'FÁGÁIN; COLLITON, 2017). As formulações em tampão MES, por outro lado, apresentaram mudanças no pH após a liofilização, em comparação com as mesmas amostras antes do procedimento. Essa mudança não afetou a estabilidade, atividade antigênica da proteína, ou causou perda de peso ou injúrias nos animais vacinados.

Um segundo ponto crítico deste projeto foi entender como a proteína recombinante se comportaria, de um ponto de vista estrutural, após o processo de liofilização. Analisando os resultados de DC apresentados, é possível observar que a proteína nas amostras secas possui estruturas mais definidas, principalmente no tempo inicial, quando comparadas a amostra padrão, a proteína mantida em PBS a -20°C. É sabido que o meio no qual certa proteína está inserida afeta de forma direta de seu dobramento, portanto, é coerente pressupor que a proteína nas amostras liofilizadas, que apresentam excipientes crio e lioprotetores, possua estruturas secundárias mais estáveis (FASMAN, 1996). Para as formulações em tampão CRIO, tais excipientes não foram capazes de manter essas estruturas durante os 180 dias de estudo, já que as amostras apresentaram aumento da porcentagem de estruturas randômicas no tempo final e diminuição da porcentagem de estruturas em α-hélice e em folhas-β antiparalelas. Porém, para as amostras formuladas em

tampão MES, o oposto foi verificado; durante o tempo, a proteína recombinante formulada nesta condição apresentou maior porcentagem de estruturas em folhas- β antiparalelas e menores de estruturas randômicas, quando comparadas ao tempo inicial, o que indica que os excipientes presentes na formulação MES conseguem estabilizar de forma mais duradoura a estrutura secundária da yPvCSP-All_{CT}.

Entretanto, mesmo com as mudanças estruturais observadas para as amostras liofilizadas e durante todo o tempo do estudo, esse fator não impediu o reconhecimento do antígeno pelo sistema imune murino. Como demonstrado acima, os títulos de anticorpos das formulações liofilizadas são comparáveis aos obtidos pela formulação padrão e com os resultados prévios já demonstrados por nosso grupo de pesquisa (DE CAMARGO et al., 2018). Comparando os títulos de anticorpos das amostras líquidas durante o primeiro protocolo, vemos que aquelas mantidas a 5°C e a 25°C não foram capazes de manter o padrão de imunogenicidade após a terceira dose semelhante àquela mantida a -20°C, apresentando títulos significativamente menores do que a amostra padrão. Isso se deve a incapacidade dessa formulação, quando armazenadas a temperaturas maiores, de manter a integridade da proteína durante o ciclo de imunização. Esse resultado demonstra a importância do desenvolvimento de maneiras para estabilização dessa formulação vacinal, já que a mesma, quando armazenada a temperaturas mais altas, não consegue resistir tempo suficiente para completar o ciclo de imunização.

Quanto os resultados dos experimentos de acompanhamento do estado da proteína, os ensaios de SDS-PAGE e *western blot* são ótimos métodos para monitorar a integridade da proteína através do tempo, porém a segunda técnica se mostrou mais sensível do que a primeira, já que conseguiu detectar bandas de degradação no tempo final para as amostras liofilizadas e armazenadas a 25°C. A análise por SEC também foi capaz de detectar alguns pontos de degradação para as amostras secas no tempo inicial, os dois picos posteriores àquele correspondente à proteína recombinante em análise. Provavelmente, esse resultado não foi visto nos ensaios de SDS-PAGE e de *western blot* devido ao possível tamanho desses produtos de degradação e tipo de gel utilizado para as

análises, que não consegue reter pequenos peptídeos, ou devido a concentrações desses produtos de degradação abaixo dos limites de detecção de ambos os ensaios. Outro resultado evidenciado pela análise da proteína por SEC para as amostras liofilizadas foi um pequeno pico anterior ao correspondente a proteína yPvCSP-All_{CT}, o que pode indicar a formação de agregados. Formulações liofilizadas são susceptíveis a esse tipo de acontecimento devido as condições de estresse nas quais uma proteína é submetida durante o ciclo de liofilização (CARPENTER; CHANG; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM RANDOLPH, 2002; LIU; ZHOU, 2015). Apesar disso, tais resultados não evidenciam uma perda na qualidade, já que em todos os ensaios, é possível observar que a concentração da proteína íntegra é maior do que os de produtos de agregação e de degradação. Assim, nenhuma diferença significativa foi observada entre as formulações liofilizadas e a amostra padrão, no que corresponde aos títulos de anticorpos, em nenhum dos protocolos de imunização. Por outro lado, o ensaio de HPLC apenas reproduziu os resultados observados pelo SDS-PAGE, além de não ser capaz de indicar os produtos de degradação vistos nos ensaios de *western blot* e SEC o que pode indicar que esta técnica talvez não seja a mais adequada para ser aplicada com o objetivo proposto neste trabalho.

6. CONCLUSÕES:

A liofilização é, portanto, uma alternativa altamente vantajosa. Como foi mostrado acima, as formulações liofilizadas testadas durante esse projeto mostraram-se mais termoestáveis do que a formulação líquida, o que permite melhores condições de armazenamento e distribuição a nível nacional e internacional. Amostras mantidas em solução líquida apenas permaneceram íntegras e sem qualquer perda de eficácia quando armazenadas a temperatura de -20°C, durante os seis meses do estudo de estabilidade, enquanto as liofilizadas se mantiveram nestas condições até mesmo quando estocadas a 25°C, por 120 dias, e por 180 dias, quando armazenadas a 5°C.

A formulação em CRIO mostrou-se menos adequada do que a formulação em MES, apesar de ambas atenderem aos propósitos do projeto. A segunda

formulação não apresentou qualquer tipo de colapso, e conseguiu manter a proteína em estruturas secundárias mais estáveis do que a primeira por um período de tempo superior. Isso não significa que a formulação não necessita ser aprimorada, afinal, apresentou valores de pH menores do que o recomendado, e mudanças afim de alterar tal resultado devem ser realizadas futuramente.

Os imunoensaios com camundongos demonstram a qualidade das formulações liofilizadas, que são capazes de induzirem altos títulos de anticorpos quando armazenadas em qualquer das temperaturas selecionadas para a realização deste trabalho, durante todo o ciclo de imunização. Apesar de tais formulações apresentarem certo grau de degradação e agregação, tanto no início quanto no final do projeto, não é observado qualquer modificação no padrão de resposta de anticorpos contra a proteína recombinante yPvCSP-AllcT.

Conclui-se, portanto, que os resultados aqui apresentados são promissores, pois demonstram que a liofilização é sim uma alternativa eficaz contra os problemas logísticos encontrados quando se pensa na distribuição, a nível nacional e internacional, de um imunizante em locais onde a malária é uma doença endêmica.

7. BIBLIOGRAFIA:

- 1- ADAMS, G. D. J. Lyophilization of vaccines: current trends. In: ROBINSON, A.; HUDSON, M. J.; CRANAGE, M. P. (Eds.). . **Methods in molecular medicine**. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2003. v. 87p. 223–244.
- ADAMS, G. D. J.; COOK, I.; WARD, K. R. The Principles of Freeze-Drying. In: WOLKERS, W. F.; OLDENHOF, H. (Eds.). . **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. New York: Springer Science+Business Media, 2015. v. 1257p. 121–143.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 304, de 17 de Setembro de 2019. . 17 set. 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 412, de 20 de Agosto de 2020. . 2020.
- ARNOT, D. E. et al. Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4727, p. 815–8, nov. 1985.
- ARNOT, D. E.; BARNWELL, J. W.; STEWART, M. J. Does biased gene conversion influence polymorphism in the circumsporozoite protein-encoding gene of Plasmodium vivax? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 8102–6, nov. 1988.
- BEXIGA, N. M. et al. Freeze-drying of ovalbumin loaded carboxymethyl chitosan nanocapsules: impact of freezing and annealing procedures on physico-chemical properties of the formulation during dried storage. **Drying Technology**, v. 26, n. 4, p. 400–417, 2018.
- BRANDAU, D. T. et al. Thermal stability of vaccines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 2, p. 218–231, 2003.
- CARPENTER, J. F.; CHANG, B. S.; GARZON-RODRIGUEZ, WILLIAM RANDOLPH, T. W. **Rational design of stable lyophilized protein**. [s.l.] University of Colorado, 2002.
- CHAN, M. Y.; DUTILL, T. S.; KRAMER, R. M. Lyophilization of Adjuvanted Vaccines: Methods for Formulation of a Thermostable Freeze-Dried Product. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.: s.n.]. v. 1494p. 215–226.
- CLÉNET, D. Accurate prediction of vaccine stability under real storage conditions

- and during temperature excursions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, n. November 2017, p. 76–84, 2018.
- CLYDE, D. F. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68 Suppl, p. 9–12, 1990.
- COCHRANE, A. H. et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 43, n. 5, p. 446–51, nov. 1990.
- COLLINS, W. E. et al. Immunization of Saimiri sciureus boliviensis with recombinant vaccines based on the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 40, n. 5, p. 455–64, maio 1989.
- CRAWLEY, J. et al. Malaria in children. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9724, p. 1468–81, abr. 2010.
- DE CAMARGO, T. M. et al. Prime-boost vaccination with recombinant protein and adenovirus-vector expressing Plasmodium vivax circumsporozoite protein (CSP) partially protects mice against Pb/Pv sporozoite challenge. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.
- EPSTEIN, J. E. et al. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8⁺ T cell immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6055, p. 475–80, out. 2011.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ICH Topic Q 5C. **Definitions**, n. July 1996, 1996.
- FASMAN, G. D. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. 1. ed. New York: Plenum Press, 1996.
- GALINSKI, M. R. et al. The circumsporozoite gene of the Plasmodium cynomolgi complex. **Cell**, v. 48, n. 2, p. 311–9, jan. 1987.
- GIMENEZ, A. M. et al. Vaccine Containing the Three Allelic Variants of the Plasmodium vivax Circumsporozoite Antigen Induces Protection in Mice after Challenge with a Transgenic Rodent Malaria Parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1275, out. 2017.

- GONZALES, R. **Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.
- GOPINATH, R. et al. Failure to detect a *Plasmodium vivax*-like malaria parasite in globally collected blood samples. **The Journal of infectious diseases**, v. 170, n. 6, p. 1630–3, dez. 1994.
- HERRINGTON, D. A. et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 257–9, 1987.
- HIERRO, L. OMS recomenda pela primeira vez na história uma vacina contra a malária | Sociedade | EL PAÍS Brasil. 6 out. 2021.
- HOLLINGDALE, M. R. Anti-sporozoite antibodies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68 Suppl, p. 47–51, 1990.
- IMWONG, M. et al. Limited polymorphism in the dihydropteroate synthetase gene (dhps) of *Plasmodium vivax* isolates from Thailand. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4393–5, out. 2005.
- JIMENEZ, M. C. S. et al. Biophysical characterization of the recombinant merozoite surface protein-3 of *Plasmodium vivax*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 7–8, p. 983–8, jan. .
- KAIN, K. C. et al. Serologic and genetic characterization of *Plasmodium vivax* from whole blood-impregnated filter paper discs. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 4, p. 473–9, abr. 1992.
- KESTER, K. E. et al. A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5359–5366, 2007.
- LIU, B.; ZHOU, X. Freeze-Drying of Proteins. In: **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. New York: Springer Science, Business Media, 2015. p. 459–476.
- MCCUTCHAN, T. F. et al. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. 21, p. 11889–94, out. 1996.

MICSONAI, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 24, p. E3095–E3103, 16 jun. 2015.

MICSONAI, A. et al. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2 jul. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento da malária no Brasil**, 2020. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_>. Acesso em: 30 out. 2021

NUSSENZWEIG, R. S. et al. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. **Nature**, v. 216, n. 5111, p. 160–2, out. 1967.

Ó'FÁGÁIN, C.; COLLITON, K. Storage and Lyophilizaion of Pure Porteins. In: WALLS, D.; LOUGHAN, S. T. (Eds.). **Protein Chromatography**. 1. ed. New York: Springer Science+Business Media, 2017. v. 1485p. 423.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of P. vivax (VK210, VK247 and P. vivax-like) in individuals naturally exposed to malaria. **Acta tropica**, v. 92, n. 1, p. 63–9, set. 2004.

PATEL, S. M. et al. Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. 7, p. 1706–1721, 2017.

QARI, S. H. et al. Wide distribution of the variant form of the human malaria parasite Plasmodium vivax. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 25, p. 16297–300, set. 1991.

QARI, S. H. et al. Global occurrence of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **The Journal of infectious diseases**, v. 168, n. 6, p. 1485–9, dez. 1993.

QARI, S. H. et al. A study of polymorphism in the circumsporozoite protein of human malaria parasites. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 50,

- n. 1, p. 45–51, jan. 1994.
- RAGLIONE, D. et al. Evaluation of the cold chain for vaccine conservation in primary healthcare centers in the South and Midwest regions of São Paulo city, Brazil, in 2011-2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 1, p. 65–74, 2016.
- RIECKMANN, K. H. et al. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57 Suppl 1, p. 261–5, 1979.
- ROSENBERG, R. et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite Plasmodium vivax. **Science (New York, N.Y.)**, v. 245, n. 4921, p. 973–6, set. 1989.
- SANTOS, E. P. Imunização em Áreas Remotas de Difícil Acesso 2017. p. 1–44, 2017.
- STEWART, M. J. et al. Plasmodium berghei sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. **Infection and immunity**, v. 51, n. 3, p. 859–64, mar. 1986.
- STORTI-MELO, L. M. et al. Plasmodium vivax circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 672–8, jul. 2009.
- TEIXEIRA, L. H. et al. Immunogenicity of a prime-boost vaccine containing the circumsporozoite proteins of Plasmodium vivax in rodents. **Infection and immunity**, v. 82, n. 2, p. 793–807, fev. 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Biological Standardization Fifty-seventh report**. Italy: [s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2020: 20 years of global progress and challenges**World Health Organization. Geneva: [s.n.].
- ZAKERI, S. et al. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical Plasmodium vivax isolates from Iran. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 11, n. 5, p. 729–37, maio 2006.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de aprovação junto a CEUA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



CEUA/FCF 079.2019-P599

C E R T I F I C A D O

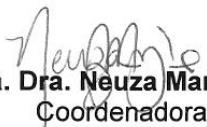
Certificamos que a proposta intitulada **Estudo de estabilidade de uma proteína recombinante baseada na Proteína Circumsporozoíta de Plasmodium vivax candidata a vacina contra a malária**, registrada com o nº **599**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Profa. Dra.Irene da Silva Soares** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **04 de Outubro de 2019**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2019 a 30/05/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Camundongo isogênico – C57BL/6</i>
Número de animais	100
Sexo	Femeas
Peso/Idade	6-8 semanas – 20-25g
Origem	Biotério FCF-IQ-USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

Ressaltamos que após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.

São Paulo, 04 de outubro de 2019.


Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
 Coordenadora CEUA/FCF/USP

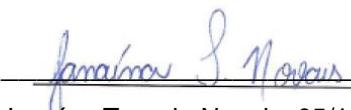
Anexo 2 - Tabelas de porcentagens das estruturas secundárias da proteína recombinante

α-Hélice					
AMOSTRAS		Inicial	30 dias	90 dias	180 dias
PBS	-20°C	0,0%	0,0%	0,0%	2,4%
	5°C	0,0%	---	---	---
	25°C	0,0%	---	---	---
CRIOD	-20°C	4,7%	16,8%	17,7%	0,0%
	5°C	4,7%	17,4%	17,4%	0,0%
	25°C	4,7%	19,4%	17,5%	0,0%
MES	-20°C	0,7%	0,8%	2,8%	0,0%
	5°C	0,7%	0,6%	0,0%	0,0%
	25°C	0,7%	0,0%	2,6%	0,0%

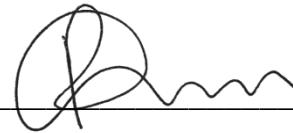
Voltas-β					
AMOSTRAS		Inicial	30 dias	90 dias	180 dias
PBS	-20°C	13,5%	15,7%	13,7%	12,6%
	5°C	13,5%	---	---	---
	25°C	13,5%	---	---	---
CRIOD	-20°C	4,1%	5,0%	3,3%	0,0%
	5°C	4,1%	2,5%	3,2%	1,7%
	25°C	4,1%	3,1%	3,8%	0,0%
MES	-20°C	22,0%	19,5%	19,6%	18,9%
	5°C	22,0%	17,9%	22,3%	18,8%
	25°C	22,0%	22,8%	19,4%	18,8%

Folhas-β antiparalelas					
AMOSTRAS		Inicial	30 dias	90 dias	180 dias
PBS	-20°C	34,1%	37,5%	34,3%	37,9%
	5°C	34,1%	---	---	---
	25°C	34,1%	---	---	---
CRIOD	-20°C	62,0%	63,3%	69,1%	41,6%
	5°C	62,0%	69,2%	68,9%	39,3%
	25°C	62,0%	69,5%	66,6%	45,2%
MES	-20°C	48,8%	34,5%	44,3%	81,1%
	5°C	48,8%	30,3%	47,5%	81,2%
	25°C	48,8%	43,4%	43,9%	81,2%

Randômicas					
AMOSTRAS		Inicial	30 dias	90 dias	180 dias
PBS	-20°C	52,4%	46,7%	52,0%	49,5%
	5°C	52,4%	---	---	---
	25°C	52,4%	---	---	---
CRIOD	-20°C	29,2%	14,9%	9,9%	58,4%
	5°C	29,2%	10,9%	10,5%	59,0%
	25°C	29,2%	8,0%	12,1%	54,8%
MES	-20°C	28,4%	45,3%	33,4%	0,0%
	5°C	28,4%	51,2%	30,2%	0,0%
	25°C	28,4%	34,4%	34,0%	0,0%



Janaína Tenorio Novais, 05/11/2021



Rodolfo Ferreira Marques, 05/11/2021