UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Estratégias do processo para a conservação da potência
da vacina rábica de uso veterinário por liofilização

Aline Tojeira Prestia Caricati

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

São Paulo
2012

Aline Tojeira Prestia Caricati

Estratégias do processo para a conservação da potência
da vacina rábica de uso veterinário por liofilização

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico aos meus tesouros

♥♥♥ *Celso, Pedro e Artur*

Os homens da minha vida!!!

"A grandeza não consiste em receber honras,

mas em merecê-las. "

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À Deus pela presença constante em minha vida.

Em especial para Maria Helena e Marcelo, pais queridos que tanto amo e admiro; À bisá Maria, vózinha linda; e aos meus irmãos, Amanda e Léo. Agradeço pela amizade, confiança, vivência e respeito compartilhados.

Ao meu estimado orientador, Professor Ronaldo Pitombo pela imensa oportunidade de crescimento científico e pessoal.

Ao pesquisador, colaborador e amigo que muito admiro Celso Caricati por possibilitar a realização deste trabalho no Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários (LEPDIV / IBu) e aos funcionários: Benê, Erica, Leme, Maicon, Mary Dalva, Natalina, Perpétua, Sidnéia e Wagner e pela colaboração e dedicação

Ao amigo e colaborador Professor Marco Antonio Stephano por todo auxílio disponibilizado, principalmente com as análises estatísticas.

À Dra. Regina Maria Mourão Fuches pela disponibilidade e paciência constantes, e enorme ajuda com a realização dos testes *in vitro* realizados na Seção de Controle Biológico do Instituto Butantan.

Ao Dr. Dennis Lara Chicoma pelo auxílio com as análises de DSC e ao Professor Reinaldo Giudici do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP pela disponibilidade do equipamento.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF / USP: Alexandre, Camila, Elaine, Elza, Gledson, Ivani, Jorge, Juarez, Mirian, Nilton Roberta e Virgílio pelo carinho e auxílio.

Ao Instituto Butantan e a Fundação Butantan pela oportunidade concedida.

À FAPESP pela aprovação do Auxílio à Projeto de Pesquisa – Regular (Proc. No: 09/52239-1).

CARICATI, A.T.P. **Estratégias do processo para a conservação da potência da vacina rábica de uso veterinário por liofilização.** 2012. 126p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Uma vacina liofilizada, em comparação a uma líquida, possui inúmeras vantagens, tais como: a melhora na estabilidade do produto às variações de temperatura aumentando sua vida de prateleira, possibilitando uma melhor logística do produto aos locais onde o acesso à rede refrigerada é difícil. O presente trabalho visou investigar as estratégias do processo para a conservação da potência da vacina rábica de uso veterinário por liofilização. O material testado foi a vacina rábica inativada (VRI). Ao total foram testados 13 excipientes com três concentrações diferentes. O processo de triagem utilizado para a escolha das melhores formulações (VRI + excipiente) foi liofilização em microplacas próprias para cultivo celular adaptadas ao liofilizador, sendo posteriormente verificada a preservação da antigenicidade da vacina por meio do teste de ELISA. A análise estatística foi realizada no programa SPSS® v.17, aplicando análise de regressão para dados categóricos. A arginina 0,5%, o PEG 3350 0,5%, a sacarose 2%, a maltose 1% e a trealose 1% foram os que deram melhores resultados, um alto “score” de antigenicidade em comparação à vacina liofilizada sem adição de excipientes. A temperatura de colapso da VRI e de suas diversas formulações foi determinada por meio de um microscópio acoplado a um módulo de liofilização. A análise térmica foi realizada em Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry – DSC). Realizou-se os seguintes testes para avaliação da VRI liofilizada em frasco ampola: microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise da estrutura da pastilha e o antibody-binding test (ABT) - Teste de ligação do anticorpo modificado para determinação da potência da VRI e suas formulações. A umidade residual da VRI com PEG3350 0,5% liofilizada foi determinada em temperatura constante de 100°C resultou em 1,60%. A pastilha da vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola apresentou a elegância farmacêutica esperada de um produto liofilizado.

Palavras-chave: vacina rábica liofilizada, excipientes.

CARICATI, A.T.P. **Strategies of the process for the conservation of the potency of rabies vaccine for veterinary use by lyophilization.** 2012. 126p. Dissertation (Master Degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

A lyophilized vaccine, compared to a liquid form, has many advantages, such as the improvement in product stability to changes in temperature by increasing its shelf life, allowing better logistics for product to locations where access to chill is difficult to achieve. This work has investigated the strategies of the process for the conservation of the potency of rabies vaccine for veterinary use by lyophilization. The material tested is an inactivated rabies vaccine (VRI). Altogether 13 excipients were tested with three different concentrations. The screening process used to choose best formulation (s) (VRI + excipient) was lyophilization in microplates suitable for cell culture adapted to the lyophilizer, and subsequently verified the preservation of the antigenicity of the vaccine through the ELISA test. Statistical analysis was performed using SPSS® v.17, applying regression analysis for categorical data. Arginine 0.5%, PEG 3350 0.5%, Sucrose 2%, Maltose 1% and Trehalose 1% were those that gave better results, a high score of antigenicity compared to the lyophilized vaccine with no added excipients. The temperature of collapse of VRI and its various formulations was determined using a microscope coupled to a module of lyophilization. Thermal analysis was performed in Differential Scanning Calorimetry (DSC). The following tests were used for evaluation of freeze-dried VRI: Scanning electron microscopy (SEM), Antibody-binding test (ABT). The residual moisture of lyophilized samples were determined in the moisture analyzer at constant temperature of 100 °C and resulted in 1.60%. The cake of lyophilized rabies vaccine + 0.5% PEG 3350 in vial showed the pharmaceutical elegance expected of a lyophilized product.

Keywords: rabies lyophilized vaccine, excipients.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Filogrupos do gênero <i>Lyssavirus</i> , distribuição geográfica e principais vetores.	27
Tabela 2. Cepas virais fixas utilizadas na produção de vacinas veterinárias inativadas.	32
Tabela 3. Vacinas veterinárias produzidas em culturas de células.	35
Tabela 4. Lista dos excipientes utilizados na formulação da VRI liofilizada em microplaca e suas diferentes concentrações.	45
Tabela 5. Resultado do RFFIT das amostras de soro dos coelhos imunizados e da IgG purificada.	65
Tabela 6. Resultado da dosagem de proteína da VRI e da IgG purificada pelo método de Bradford.	67
Tabela 7. Análise estatística dos excipientes formulados com a VRI utilizando a regressão de dados categóricos (SPSS® v. 17) sendo os resultados em verde das formulações que mostraram alto “score” de antigenicidade da VRI liofilizada e em vermelho o excipiente que mostrou o menor “score” de antigenicidade da VRI considerando a manutenção da potência da VRI durante a liofilização.	77
Tabela 8. Visualização dos excipientes de acordo com a divisão de importância, sendo os que melhoraram a antigenicidade da potência da VRI aqueles que estão em verde.	79
Tabela 9. Diferentes formulações da VRI liofilizadas em frasco ampola.	96
Tabela 10. Resultado dos testes de potência (pelo método ABT) realizados com as formulações de VRI e excipientes que melhoraram a antigenicidade.	98
Tabela 11. Resultado da umidade residual da vacina rábica com PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola (n=4).	111
Tabela 12. Parâmetros da equação de BET para vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando a estrutura do vírus da raiva.	28
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva, evidenciando-se os processos de adsorção, penetração, replicação, maturação e liberação de novas partículas virais infectantes.	30
Figura 3. Vista dorsal (A) e lateral (B) de frascos T, com células em cultivo, de diferentes tamanhos de área e utilizados para o cultivo estático de células BHK ₂₁ (Marcas: TPP® – tampa amarela, Nunc® – tampa azul e Falcon® – tampa branca).	46
Figura 4. Estante rotatória (Bellco®) para cultivo de células em garrafas roller dentro de estufa microbiológica (FAE system®) (A), garrafas roller de vidro borossilicato (1250 cm ²) (B).	47
Figura 5. Fórmula para cálculo do volume de inóculo viral utilizado.	48
Figura 6. Etapas do processo de produção da VRI.	49
Figura 7. Etapas do RFFIT para dosagem de potência do soro antirrábico.	51
Figura 8. Etapas do ELISA para verificação da perda ou manutenção da antigenicidade da VRI e de suas diversas formulações após o processo de liofilização.	54
Figura 9. Etapas do ABT para dosagem de potência da vacina rábica.	58
Figura 10. Foto do micro ensaio de Bradford em placas de micro titulação.	66
Figura 11. Dosagem de proteína da IgG purificada e da VRI.	66
Figura 12. ELISA para determinação da concentração ótima de VRI e soro antirrábico equino.	68
Figura 13. Curva de absorbância das diluições seriadas da VRI.	68
Figura 14. Curva de absorbância das diluições seriadas do soro antirrábico equino.	69
Figura 15. Teste de liofilização da vacina em microplacas contendo diversas formulações de excipientes.	71
Figura 16. Distribuição das diferentes formulações da VRI + excipientes nas microplacas (placas de 1 a 3, da esquerda para a direita)	72

Figura 17. Fechamento das microplacas (com as diferentes formulações da VRI + excipientes) com rolhas butílicas no 1º estágio para permitir a saída do vapor (placas de 1 a 3, da esquerda para a direita)	72
Figura 18. Distribuição das amostras na microplaca 1 (à esquerda) e visualização das formulações após término do processo de liofilização (à direita)	73
Figura 19. Distribuição das amostras na microplaca 2 (à esquerda) e visualização das formulações após término do processo de liofilização (à direita)	74
Figura 20. Distribuição das amostras na microplaca 3 (à esquerda) e visualização das formulações após término do processo de liofilização (à direita)	75
Figura 21. Os excipientes que estiverem à esquerda apresentaram baixo “score” de antigenicidade. Os excipientes que estiverem no meio apresentaram médio “score” de antigenicidade e os excipientes que estiverem à direita (em verde) apresentaram alto “score” de antigenicidade em relação à VRI durante a liofilização.	78
Figura 22. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI sem adição de excipientes (pura). Durante o resfriamento temos a foto da VRI líquida (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -23,9°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -47°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis (E), terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).	81

Figura 23. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + MEM. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de $-24,1^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (D) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-44,1^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).

82

Figura 24. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de $-24,1^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-41,5^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (E).

83

Figura 25. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + PEG 3350 0,5%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de $-23,3^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (D) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-29,4^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).

84

Figura 26. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Sacarose 2%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -22,7°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (B) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -51,9°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (C) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (D).

85

Figura 27. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Maltose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -20,6°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -54,8°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

86

Figura 28. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Trealose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de -25,5°C. Próximo a -49,7°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D e E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).

87

Figura 29. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Sacarose 2%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de -25,4°C. Próximo a -56,5°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

88

Figura 30. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Maltose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -24,3°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -53,3°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

89

Figura 31. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Trealose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -24,7°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -54,3°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

90

Figura 32. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização do MEM. Durante o resfriamento temos a foto do meio no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -24°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C e D) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -43,3°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

91

Figura 33. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização do PBS. Durante o resfriamento temos a foto do tampão no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de -20,9°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (D e E) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -44,9°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (F) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

92

Figura 34. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) sem adição de excipientes. O pico da cristalização ocorreu em -13,83°C. Em seguida ocorreu um eutético em -21,25°C provavelmente relacionado à presença de NaCl no meio de cultivo MEM. Por fim a fusão da VRI ocorreu em 0,64°C.

93

Figura 35. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) com PEG 3350 0,5%. O pico da cristalização ocorreu em -18,13°C. Em seguida ocorreu um eutético em -29,67°C e por fim a fusão ocorreu em -0,23°C.

94

Figura 36. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) diluída em PBS (solução tampão de fosfato). O pico da cristalização ocorreu em -13,55°C. E depois uma transição vítrea a -56,04°C. Em seguida ocorreu um eutético em -20,95°C. Por fim a fusão da VRI ocorreu em 1,09°C.

94

Figura 37. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) diluída em MEM 2% SFB (Meio de cultivo celular Minimum Essential Medium com 2% de soro fetal bovino). O pico da cristalização ocorreu em -13,73°C. Depois um eutético em -21,22°C. Por fim a fusão da VRI ocorreu em 0,44°C.

95

Figura 38. Fotografia do equipamento (FTS) mostrando ensaio da liofilização da vacina em frasco ampola no momento do fechamento das rolhas por meio da compressão das placas.

97

Figura 39. Processo de liofilização das formulações da vacina em frasco ampola.

97

Figura 40. Gráfico demonstrando que o processo de liofilização não causou diferença significativa na potência da vacina independente do excipiente utilizado. Foi realizado teste t de student para amostras emparelhadas que resultou em $p=0,21258$ ($p>0,05$).	99
Figura 41. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica pura liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	100
Figura 42. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica pura liofilizada em frasco ampola.	100
Figura 43. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + MEM 2% SFB (soro fetal bovino) liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	101
Figura 44. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + MEM 2% SFB (soro fetal bovino) liofilizada em frasco ampola.	101
Figura 45. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de meio de cultura MEM + 2% de Soro Fetal Bovino (MEM – Minimum Essential Medium) liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	102
Figura 46. Imagens das pastilhas formadas com o MEM (Minimum Essential Medium) + 2% SFB (soro fetal bovino) liofilizado em frasco ampola.	102
Figura 47. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	103
Figura 48. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + arginina 0,5% liofilizada em frasco ampola.	103
Figura 49. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	104
Figura 50. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.	104

Figura 51. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + maltose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	105
Figura 52. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + maltose 1% liofilizada em frasco ampola.	105
Figura 53. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + sacarose 2% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	106
Figura 54. Imagem do pó formado com a vacina rábica + sacarose 2% liofilizada em frasco ampola.	106
Figura 55. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + trealose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	107
Figura 56. Imagem do pó formado com a vacina rábica + trealose 1% liofilizada em frasco ampola.	107
Figura 57. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ maltose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	108
Figura 58. Imagem do pó formado com a vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ maltose 1% liofilizada em frasco ampola.	108
Figura 59. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ sacarose 2% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	109
Figura 60. Imagem do pó formado com a vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ sacarose 2% liofilizada em frasco ampola.	109
Figura 61. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ trealose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.	110
Figura 62. Imagem do pó formado com a vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ trealose 1% liofilizada em frasco ampola.	110

Figura 63. Efeito da temperatura sobre as isotermas de sorção de umidade da vacina rábica com PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.	113
Figura 64. Representação gráfica da equação de BET vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.	114

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Histórico da doença no mundo	21
1.1.2. Histórico no Brasil - Raiva dos herbívoros	23
1.2. O vírus da raiva	25
1.2.1. Estrutura e morfologia do vírus da raiva.....	27
1.2.2. Replicação viral	29
1.3. Vacinas veterinárias produzidas em cultura celular	30
1.3.1. Substratos para a produção de antígeno vacinal.....	31
1.3.1.1. Cepas virais	31
1.3.1.2. Culturas celulares	33
1.3.1.2.1. Células primárias.....	33
1.3.1.2.2. Linhagens celulares contínuas	33
1.4. Produção da vacina	34
1.4.1. Produção do inóculo viral	34
1.4.1.1. Vacinas vivas atenuadas	35
1.4.1.2. Vacinas inativadas	35
1.5. Recomendações de uso e principais parâmetros de produção para vacinas rábicas veterinárias.....	36
1.5.1. Vacinas vivas atenuadas	36
1.5.2. Vacinas inativadas	37
1.5.3. Testes de controle.....	37
1.6. Liofilização.....	38
1.7 Excipientes	41
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Geral	43
2.2. Específico	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Material.....	44
3.1.1. Vacina.....	44
3.1.2. Lioprotetores/ Crioprotetores/ Aditivos/ Excipientes.....	44
3.2. Métodos.....	45
3.2.1. Culturas celulares	45

3.2.2. Contagem celular	46
3.2.3. Inoculação de vírus rábico em células BHK21	47
3.2.4. Purificação da suspensão viral.....	48
3.2.5. Inativação viral	48
3.2.6. Dosagem de potência da vacina rábica inativada - Teste NIH (National Institutes of Health).....	50
3.2.7. Imunização dos coelhos para obtenção de IgG antirrábica purificada	50
3.2.8. Teste rápido de inibição do foco fluorescente RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test)	50
3.2.9. Purificação do soro dos coelhos com ácido caprílico para obtenção da IgG antirrábica purificada.....	52
3.2.10. Doseamento de proteína da IgG purificada para o coating da placa de ELISA.....	52
3.2.11. Dosagem de proteína pelo método de Bradford.....	52
3.2.12. Estabelecimento das concentrações ideais da IgG purificada e da VRI para realização do teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ensaio imunoenzimático).....	52
3.2.13. Liofilização em microplaca.....	55
3.2.14. Análise estatística – Regressão de dados categóricos	56
3.2.15. Microscopia ótica acoplada à liofilização	56
3.2.16. Análise térmica das diferentes formulações da vacina rábica inativada e dos excipientes	56
3.2.17. Liofilização em frasco ampola	57
3.2.18. Teste de ligação do anticorpo modificado - Antibody-binding test (ABT)	57
3.2.19. Microscopia eletrônica de varredura	59
3.2.20. Determinação do conteúdo de umidade	59
3.2.21. Isotermas de adsorção de umidade.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Produção da VRI.....	62
4.2. Potência da VRI pelo NIH.....	62
4.3. Resultados de testes de RFFIT de amostras de soros de coelho e da IgG antirrábica purificada.....	64
4.4. Dosagem de proteína pelo método de Bradford	65
4.5. Padronização do teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ensaio imunoenzimático).....	67

4.6. Liofilização das diferentes formulações da VRI em microplaca	69
4.7. Análise estatística – Regressão de dados categóricos	76
4.8. Simulação do processo de liofilização em liofilizador acoplado ao microscópio óptico	80
4.9. Curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC - Differential Scanning Calorimetry)	92
4.10. Liofilização em frasco ampola	95
4.11. Antibody-binding test (ABT) – Teste de ligação do anticorpo modificado	98
4.12. Microscopia eletrônica de varredura	100
4.13. Determinação da umidade residual	111
4.14. Isotermas de adsorção de umidade.....	111
5. CONCLUSÕES	116
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da doença no mundo

A raiva é considerada uma das zoonoses de maior importância em Saúde Pública, não só por sua evolução drástica e letal, como também por seu elevado custo social e econômico (BINAGRI, 2005).

A raiva possui uma longa e interessante história, que caminha desde seus primeiros relatos há séculos antes de Cristo, sempre ao lado da evolução da humanidade.

Homero, na *Ilíada* refere-se à raiva quando cita que Sirius, a estrela cão de Orion, exercia uma influência maligna sob a saúde dos humanos. Na realidade ele estava associando Sirius aos cães raivosos que estavam disseminando a doença no Mediterrâneo oriental, Egito e mais tarde em Roma.

Os gregos chamavam a raiva de *Lyssa* ou *Lytta*, que significa loucura. A doença no homem foi denominada hidrofobia, na qual a pessoa afetada ao mesmo tempo em que sentia sede tinha pavor da água. A palavra em Latim para raiva vem de uma palavra antiga em Sânscrito “*rabhas*” que traduzida significa se tornar violento.

Desde o princípio ela foi associada aos cães, sendo esses até hoje um dos principais transmissores do vírus, especialmente ao homem. Mesmo com poucos recursos científicos, os pesquisadores da época acabaram por associar que a transmissão se dava através da saliva, a qual se acreditava que continha um veneno denominado em Latim de “*virus*”. Posteriormente acreditaram que o transmissor seria um verme presente na língua do cão raivoso.

Como nenhuma das técnicas de cura sugerida às pessoas e animais mordidos tinha êxito, pois se baseavam em superstições, e cada vez mais aumentava o número de ataques de cães, lobos, raposas e até ursos raivosos a cidades e vilarejos, as autoridades sugeriram à população a matança de todos os cães de rua, além de lobos e raposas. Em alguns locais, para incentivar ainda mais a população, era oferecida recompensa por cada animal morto.

A raiva não foi detida e ao invés disso se espalhou pela Europa, Ásia, África e América, se mantendo endêmica e atingindo desde a plebe até a realeza, como por exemplo, o Duque de Richmond, Governador Geral do Canadá, que morreu de hidrofobia poucos dias após ser mordido por uma raposa de estimação perto de Ottawa.

Enquanto os cientistas pesquisavam uma cura para a raiva inoculando material da glândula salivar de animais acometidos, Louis Pasteur descobriu, em 1881, que inoculando material do sistema nervoso central e fluido espinhal dos animais raivosos em animais sadios induzia a raiva, determinando assim outra fonte de contaminação do vírus. Descobriu também que inoculando o material virulento intracerebralmente nos animais sadios, o período de incubação era bem mais curto, facilitando assim a sua pesquisa.

Pasteur realizou diversos experimentos, fazendo diversas passagens do material contaminado para diferentes espécies animais, percebendo que a cada passagem o vírus diminuía sua capacidade virulenta.

Mas foi em 1885 que Pasteur publicou detalhadamente seu método de produção de uma vacina eficaz para a profilaxia da raiva. O primeiro passo era a inoculação intracerebral de um vírus de rua, em um coelho sadio e então a passagem sucessiva em outros coelhos até que o período de incubação encurtasse e chegasse ao tempo fixo de 7 dias. Os cordões espinhais desses coelhos eram retirados e então mantidos alguns dias suspensos em ar seco para diminuição da virulência. A imunização era feita em cães, inoculando subcutaneamente, um caldo com uma quantia bem pequena de cordão seco de forma a se transformar avirulento, sucessivamente era usado uma maior quantia de cordão e também cada vez mais virulento até chegar a um cordão completamente virulento. Como resultado, os 50 cães se tornaram refratários à raiva.

Neste mesmo ano, Pasteur pode comprovar a eficiência de sua vacina em um humano, o garoto de 9 anos Joseph Meister que chegou da Alsácia com 14 mordidas de um cão raivoso. Em 6 de julho, às 20 horas, foi inoculado subcutaneamente no hipocôndrio direito do pequeno Meister meia seringa de cordão de coelho raivoso preservado em frasco com ar seco por 15 dias. Treze inoculações posteriores foram realizadas com um aumento gradativo da virulência dos cordões e o menino nunca desenvolveu nenhum sintoma de raiva.

Com a suposta cura da raiva descoberta e sua eficácia comprovada, tratou-se de ser fundado o Instituto Pasteur, primeiramente a sede em Paris, e depois com suas filiais distribuídas pelo mundo inteiro.

Com o passar do tempo muito foi descoberto e melhorado, contribuindo para o desenvolvimento de técnicas mais eficazes e menos reativas aos pacientes, além de melhorias nos esquemas de tratamento profilático da raiva tanto na pré quanto na pós-exposição ao vírus, além do desenvolvimento de vacinas com cepas específicas de cada região e da produção de um soro antirrábico mais puro.

Atualmente, além da Oceania e Antártica que sempre foram livres de raiva, Japão, Taiwan, Malásia, Cingapura e Hong Kong foram capazes de acabar com as ocorrências de raiva humana e animal.

Isso se deve basicamente a três pontos básicos e fundamentais para a prevenção e erradicação da raiva: educação, controle da população de cães e vacinação. Educação para que seja aceito e seguido a posse responsável; o controle da população de cães, já que estes são os principais transmissores da raiva a nós humanos e vacinação dos animais susceptíveis para a prevenção da doença, que hoje já se sabe pode ser adquirida inclusive através de aerossóis pela via respiratória (BAER, 1991).

1.1.2. Histórico no Brasil - Raiva dos herbívoros

A raiva paralítica de bovinos foi diagnosticada pela primeira vez por Carini em 1911 no estado de Santa Catarina, quando corpúsculos de Negri foram identificados nos tecidos nervosos de cérebros de bovinos mortos por uma doença então misteriosa. Os colonos da região acreditavam que a doença era causada pelos morcegos hematófagos e Carini mencionou este fato em seu artigo publicado no *Annales de L'Institut Pasteur* de Paris. Pesquisadores da época classificaram o relato de Carini como uma "fantasia tropical".

Em 1916, Haupt e Rehaag (citado por BINAGRI, 2005) veterinários alemães contratados pelo governo catarinense, identificaram o vírus da raiva no cérebro de morcegos hematófagos. Muitas contestações se sucederam após o relato de Carini e de Haupt e Rehaag, pois o mundo relutava em aceitar que os morcegos pudessem ser "reservatórios" de vírus da raiva, considerando que naquela época Louis Pasteur

afirmava que "para ser raiva, havia a necessidade do envolvimento de um cão raivoso". Nos episódios de Santa Catarina não havia relatos de ocorrência da doença em cães (BINAGRI, 2005).

Entre 1925 e 1929, foi registrada a ocorrência de botulismo em bovinos e de poliomielite ascendente em seres humanos, na ilha de Trinidad, no Caribe. Dois médicos, Hurst e Pawan, confirmaram que a doença em bovinos e humanos se tratava de raiva, transmitida por morcegos hematófagos. Após os trabalhos de Queiróz Lima (1934), Torres e Queiróz Lima (1935) e Hurst e Pawan (1931-1932), aceitou-se finalmente a idéia de que morcegos hematófagos podiam transmitir raiva aos animais e aos seres humanos.

A introdução de técnicas de biologia molecular e a utilização de anticorpos monoclonais permitiram o conhecimento dos principais reservatórios silvestres do vírus da raiva, assim como sua associação às áreas geográficas.

Estima-se que a raiva bovina na América Latina cause prejuízos anuais de centenas de milhões de dólares, provocados pela morte de milhares de cabeças, além dos gastos indiretos que podem ocorrer com a vacinação de milhões de bovinos e inúmeros tratamentos pós-exposição (soro vacinação) de pessoas que mantiveram contato com animais suspeitos. No Brasil a raiva dos herbívoros pode ser considerada endêmica e em graus diferenciados, de acordo com a região (BINAGRI, 2005).

A raiva dos herbívoros é responsável por prejuízos econômicos diretos na América Latina da ordem de 30 milhões de dólares/ano, sendo que no Brasil este valor se aproxima de 15 milhões de dólares/ano, com a morte de cerca de 40.000 cabeças bovinas. O Brasil é um dos países que mais tem sofrido às conseqüências da raiva dos herbívoros, fato este agravado ainda mais com o elevado número de subnotificações, causado pela falta de conscientização dos produtores e pela ineficiência de uma vigilância epidemiológica dos órgãos oficiais envolvidos no seu controle. Considera-se que, para cada caso notificado, outros dez não o são. Para o adequado controle da raiva dos herbívoros, três medidas devem ser adotadas sistematicamente: vacinação, controle populacional do morcego hematófago e atendimento a foco (Kotait *et al.*, 1998).

Desde 1996 a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) iniciou um projeto para o estudo da epidemiologia molecular do vírus da raiva isolado nas

Américas e no Caribe, que incluía a utilização de um painel de anticorpos monoclonais cedido pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC Centers for Disease Control and Prevention), situado em Atlanta (EUA). Tal estudo permite associar alguns reservatórios a variantes antigênicas conhecidas do vírus da raiva, como, por exemplo, a variante 3, associada ao morcego hematófago *Desmodus rotundus* (principal reservatório em nosso meio); as variantes 1 ou 2, relacionadas à raiva em populações de cães; ou ainda a variante 4, relacionada ao vírus da raiva mantido e transmitido por populações de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis* e outras já estabelecidas (BINAGRI, 2005).

1.2. O vírus da raiva

A raiva é uma encefalite aguda e progressiva, causada por um vírus RNA da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. O vírus da raiva é o único *Lyssavírus* conhecido no Novo Mundo, sendo que algumas regiões são consideradas livres, tais como: Havaí e muitas ilhas no Oceano Pacífico e Caribe (exceto Cuba, República Dominicana, Haiti, Granada e Porto Rico). No entanto, a continuidade deste “status livre” de raiva depende de métodos efetivos para prevenir a introdução do vírus e depende da atividade laboratorial, baseada na vigilância epidemiológica (Rupprecht e Gibbons, 2004).

Estão descritos mais de 100 rhabdovírus que infectam diferentes animais vertebrados (mamíferos, peixes e répteis), invertebrados e plantas, o que demonstra a grande diversidade da família *Rhabdoviridae*. Embora esta família possua sete gêneros, apenas três infectam mamífero sendo o de maior importância o gênero *Lyssavirus*, representado pelo vírus da raiva (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Quatro sorotipos do gênero *Lyssavirus* foram definidos após a realização de testes de imunidade cruzada em camundongos (Schneider *et al.*, 1973) e testes utilizando anticorpos monoclonais, (Wiktor, Flamand e Koprowsky, 1980).

Ao sorotipo 1 distribuído mundialmente, correspondia às amostras clássicas, representadas pelas amostras de vírus fixo ou vacinal e amostras selvagens, isoladas da maioria dos mamíferos terrestres e de morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros das Américas. Ao sorotipo 2 correspondia o vírus Lagos Bat, amostras isoladas de morcegos e de um gato da região de Lagos na Nigéria, África.

Ao sorotipo 3 correspondia o vírus Mokola, isolado de roedores e humanos, também na África. O sorotipo 4 era representado pelo vírus Duvenhage, isolado de morcegos e humanos, na África (Wiktor, Flamand e Koprowsky, 1980).

Os vírus detectados em morcegos insetívoros na Europa, denominados lissavírus de morcego europeu (European Bat Lyssavirus - EBL1 e 2) foram identificados como vírus aparentados, porém não foram classificados como novos sorotipos (Schneider, 1982). Com a evolução dos estudos antigênicos e genéticos, passou-se a utilizar a nomenclatura de genótipos (Bourhy, 1992; Van Regenmortel *et al.*, 2000). Atualmente são classificados sete genótipos (GT) dos lissavírus (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

Os sete genótipos (tabela 1) são classificados em dois filogrupos, de acordo com as características sorológicas e patogênicas (Rotivel *et al.*, 2002), sendo que mais quatro variantes virais são conhecidas, e poderão ser considerados novos lissavírus relacionados ao vírus da raiva, todos isolados de morcegos.

A variante *Aravan virus*, isolada em 1991, de um morcego insetívoro (*Myotis blythi*), no Kirguistão, Ásia Central, descrita em 2003 (Arai *et al.*, 2003; Kuzmin *et al.*, 2003); a variante *Khujond*, isolada em 2001, no noroeste do Tajikistão, Ásia Central, também em morcegos insetívoros (*Myotis mystacinus*) (Kuzmin *et al.*, 2003).

Na Rússia foram isoladas outras duas variantes, denominadas *Irkut virus*, na cidade de Irkutsk, em morcego *Murina leucogaster* e *West Caucasian bat virus* (WCBV), no Caucasus, de um morcego *Miniopterus schreibersi*. (Botvinkin *et al.* 2003).

Tabela 1. Filogrupos do gênero *Lyssavirus*, distribuição geográfica e principais vetores.

Espécie Viral	Geografia	Principais Vetores
Filogrupo 1		
GT1: Vírus clássico da raiva	Mundo	Carnívoros e Morcegos
GT4: Vírus <i>Duvenhage</i>	África	Morcegos Insetívoros
GT5: <i>European bat lyssavirus 1-EBL1 (Eptesicus sp)</i>	Europa	Morcegos Insetívoros
GT6: <i>European bat lyssavirus 2-EBL2 (Myotis sp)</i>	Europa	Morcegos Insetívoros
GT7: <i>Australian bat lyssavirus – ABL (Pteropus sp)</i>	Australia	Morcegos Frugívoros e Insetívoros
Filogrupo 2		
GT2: Vírus <i>Lagos bat</i>	África	Morcegos Frugívoros
GT3: Vírus <i>Mokola</i>	África	Roedores

Fonte: Rotivel *et al.*, 2002.

1.2.1. Estrutura e morfologia do vírus da raiva

A maioria dos rhabdovírus é cilíndrica, têm forma de “bala de fuzil”, com uma extremidade arredondada e outra plana. O vírus da raiva possui, em média, 180nm de comprimento e 75nm de diâmetro (Murphy, 1991).

Os diferentes genótipos do gênero *Lyssavirus* são formados pela combinação de cinco proteínas estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P, M1 ou NS), proteína de matriz (M ou M2), glicoproteína (G) e a RNAPolimerase viral (L), de modo que a partícula viral completa contém de 2 a 3% de ácido ribonucléico (RNA), 67% de proteínas, 26% de lipídeos e 3% de carboidratos (Kaplan, Turner e Warrel, 1986). Estas cinco proteínas constituem duas estruturas principais, segundo suas funções biológicas: as ribonucleoproteínas (RNPs) e o envelope viral (Figura 1).

As ribonucleoproteínas (RNPs), ou nucleocapsídeo, apresentam-se sob a forma de um complexo helicoidal constituído de RNA de fita simples associado às proteínas N, L e NS (Tordo *et al.*, 1986).

A proteína N é constituída por 450 aminoácidos, com peso molecular de 50,5 kDa e é a proteína de maior importância no processo de encapsidação, preenchendo o cilindro helicoidal do nucleocapsídeo (Tordo *et al.*, 1986).

A fosfoproteína NS é constituída por 297 aminoácidos, com peso molecular de 33 kDa e está relacionada à replicação viral, assim como a proteína L (RNA - polimerase), que é constituída por 2.214 aminoácidos, com peso molecular de 244,2 kDa e é responsável pelas atividades enzimáticas, necessárias para a transcrição e replicação viral (Lafon e Wiktor, 1985).

Figura 1. Esquema representando a estrutura do vírus da raiva (Fonte: adaptado de Bourhy, Sureau e Tordo, 1990).

O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica, à qual estão associadas duas proteínas: a proteína M e a glicoproteína G.

A proteína M localiza-se na face interna do envelope lipídico, tendo como função a ligação entre o envelope e o complexo RNPs, além de regular a replicação viral. Esta proteína constitui a matriz protéica do vírus da raiva, sendo constituída por 202 aminoácidos, com peso molecular de 23 kDa (Tordo *et al.*, 1986). Outra função atribuída à proteína M é a regulação da polimerase viral, suprimindo completamente

a atividade de transcrição da polimerase, durante o processo de brotamento do vírus da célula hospedeira (Ito *et al.*, 1996).

A proteína responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira é a glicoproteína G, a qual é uma proteína transmembranária que forma espículas glicosiladas na superfície viral, sendo constituída por 524 aminoácidos, com peso molecular de 58,5 kDa, (Tordo *et al.*, 1986).

A glicoproteína G é o único antígeno viral capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes (AcN) (Cox, Dietzschold e Schneider, 1977), além de possuir funções biológicas, como a de servir como receptor na superfície dos vírus e como sítio de ligação de anticorpos.

1.2.2. Replicação viral

O vírus da raiva é constituído por um genoma de uma única molécula de RNA não segmentado, de fita-simples com polaridade negativa (3' – 5'). A molécula não é diretamente traduzida pela máquina celular, mas serve de molde para uma transcrição autônoma, dando origem às moléculas complementares positivas, capazes de produzir novas partículas virais (Tordo, 1991).

Para infectar uma célula, o vírus da raiva se fixa ao receptor celular, através da glicoproteína G presente no envelope viral, e em seguida penetra na célula por endocitose e pelo contato com lisossomos libera as ribonucleoproteínas (Lentz *et al.* 1982, 1984; Surpeti, Dered e Tsiang, 1984).

As ribonucleoproteínas, quando liberadas no citoplasma celular, iniciam o processo de transcrição e replicação. A polimerase L (RNA – polimerase viral) inicia a transcrição dos cinco genes estruturais do vírus. A transcrição do RNA genômico se efetua da extremidade 3' em direção à extremidade 5', produzindo primeiro um RNA líder e depois cinco RNAs mensageiros, que correspondem às proteínas N, NS, M, G e L. Em seguida, há uma segunda etapa replicativa, na qual as fitas positivas serão moldes para a produção de fitas negativas complementares (Banerjee, 1987).

Todas as proteínas virais são traduzidas pela “maquinaria” da célula hospedeira. As proteínas N, NS, M e L são sintetizadas nos ribossomos livres no citoplasma, enquanto que a glicoproteína (G) é sintetizada nos ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático (RE). Após a síntese da G, esta é

transportada para dentro do RE, onde se iniciam os processos de formação de trímeros e a glicosilação, a qual só termina no complexo de Golgi (CG) (Shakin-Eshleman *et al.*, 1992; Whitt *et al.*, 1991; Gaudin *et al.*, 1992; Kornfeld e Kornfeld, 1985).

Uma vez que grandes quantidades de proteínas virais são formadas, inicia-se o processo de montagem do ribonucleocapsídeo e saída das novas partículas virais da célula hospedeira, o que ocorre enquanto a célula se mantém metabolicamente competente. A morfogênese viral está associada com a formação de uma matriz intracitoplasmática, conhecida como corpúsculos de Negri - patognomônicos para raiva, o que antecede a formação das novas partículas virais (Matsumoto, 1962).

Nos estágios finais, a partícula viral madura é revestida com a membrana plasmática celular, formando, juntamente com a glicoproteína, o envelope viral e finalmente liberando novas partículas virais infectantes (Wunner, 2002).

A representação esquemática da replicação do vírus da raiva está sumarizada na figura 2.

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus da raiva, evidenciando-se os processos de adsorção, penetração, replicação, maturação e liberação de novas partículas virais infectantes. (Fonte: Caporale, 2006).

1.3. Vacinas veterinárias produzidas em cultura celular

O advento da técnica de cultura de células *in vitro* provocou um enorme desenvolvimento na área da Virologia. As primeiras tentativas de adaptação do vírus da raiva, para multiplicação em culturas celulares (Levaditi, 1913), não tiveram sucesso. O primeiro avanço significativo na área foi conquistado por Kissling em 1958, quando obteve um vírus CVS (Challenge Virus Standard – cepa de vírus desafio padrão) cultivado em células primárias de rim de hamster com alto título viral (Abelseth, 1973).

Daí em diante um grande número de pesquisadores pelo mundo todo relataram a adaptação de diversas cepas do vírus da raiva, fixas e de campo, adaptadas a diferentes culturas de células, primárias e de linhagem. A maioria desses estudos resultou no desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas de uso veterinário (Abelseth, 1973). Essa tecnologia caracteriza a segunda geração de vacinas veterinárias que substituiu, gradualmente, os métodos de produção de vacinas em cérebro de animais (Meslin *et al.*, 1996).

1.3.1. Substratos para a produção de antígeno vacinal

1.3.1.1. Cepas virais

As vacinas veterinárias produzidas em culturas de células são caracterizadas pela cepa viral utilizada, pela inativação ou atenuação da massa viral antigênica e pelo substrato celular utilizado para a multiplicação viral.

As principais cepas virais utilizadas na produção de vacinas veterinárias são apresentadas na tabela 2.

Independentemente do tipo de vacina, antes de se iniciar a produção, é importante determinar as características específicas da cepa selecionada:

- através do estudo da história da cepa viral desde sua origem até a última passagem que constituirá o inóculo inicial.
- verificando sua pureza, imunogenicidade e identidade. O melhor método de identificação é obter um mapa antigênico do vírus com a utilização de um painel de anticorpos monoclonais.
- verificando-se a patogenicidade residual, se a cepa será utilizada para a produção de vacinas vivas (Meslin *et al.*, 1996).

Tabela 2. Cepas virais fixas utilizadas na produção de vacinas veterinárias inativadas.

Cepa viral	Origem	Adaptação in vitro
Paris Pasteur	Isolado de um bovino em 1882, na França.	Acima de 300 passagens em cérebro de coelho; também adaptado em células Vero.
PV	Vírus da raiva fixado em coelho por Pasteur	Adaptado em cérebro de coelho, células fetais de rim bovino, BHK ₋₂₁ e Vero.
PM (Pitman-Moore)	Vírus rábico fixo PV	Adaptado em cérebro de coelho, células humanas diplóides, primárias de rim canino, Vero e Nil-2.
CVS (Challenge Virus Standard)	Vírus rábico fixo PV	Adaptado em cérebro de camundongo, células BHK ₋₂₁ e embrionárias de galinha.
Nishigara	Vírus rábico fixo PV (Japão, 1915).	Adaptado em cérebro de coelho e células cerebrais de cobaios lactentes
Fuenzalida S-51	Isolado de um cão raivoso no Chile, em 1943.	Adaptado em células cerebrais de camundongo
Fuenzalida S-91	Isolado de um humano no Chile, em 1943.	Adaptado em células cerebrais de camundongo
Kelev	Isolado de um cão raivoso em Israel, em 1950.	100 passagens em células embrionárias de galinha; também adaptado em células cerebrais de camundongo.
SAD (Street - Alabama Dufferin)	Isolado de um cão que morreu no Alabama, EUA, em 1935.	Adaptado em cérebro de camundongo e células BHK ₋₂₁
ERA (Evelyn Rokitniki Abelseth)	Vírus SAD	Adaptado em células de rim suíno e BHK ₋₂₁
Vnukovo-32	Vírus SAD	Adaptado em células primárias de rim de hamster
Flury	Isolado de um humano na Geórgia, EUA, em 1939.	Adaptado em células embrionárias de galinha
LEP	Cepa Flury	40-50 passagens em células embrionárias de galinha; adaptado. Também em células embrionárias primárias de galinha e BHK ₋₂₁
HEP	Cepa Flury	Acima de 180 passagens em células embrionárias de galinha; também adaptado em células embrionárias primárias de galinha.

Fonte: Meslin *et al.*, 1996.

1.3.1.2. Culturas celulares

Dois tipos de substrato celular são geralmente utilizados na produção de vacinas rábicas para uso veterinário, são eles:

- Células primárias obtidas de órgãos de animais adultos, recém-nascidos ou embriões. A principal fonte dessas células é o tecido renal de hamster, fetos bovino, canino ou suíno e tecido embrionário de galinha.
- Células diplóides ou de linhagem contínua (imortalizada). Essas linhagens celulares são, principalmente, derivadas de células renais de hamster, como as linhagens BHK-21 e Nil-2 (Meslin *et al.*, 1996).

1.3.1.2.1. Células primárias

Para a obtenção de células primárias de um determinado órgão é necessário dissociar a massa tecidual em células individualizadas. Após sucessivas passagens, essas culturas darão início à formação do banco de células semente e, finalmente, ao banco de células trabalho, os quais serão mantidos congelados em nitrogênio líquido (Meslin *et al.*, 1996).

1.3.1.2.2. Linhagens celulares contínuas

Embora algumas linhagens de células BHK-21 possam crescer em suspensão, a maior parte das vacinas veterinárias produzidas com a utilização de células de linhagem contínua é preparada utilizando-se células BHK-21 e Nil-2 dependentes de ancoragem ou adesão.

Partindo-se de uma única ampola de células do banco trabalho, inicia-se a multiplicação celular em cultivo estático em pequenos frascos. Amplia-se a escala desses cultivos até frascos roller para obter-se a quantidade de células necessária para a produção de uma batelada de vacina.

Em frascos roller é possível atingir densidades celulares entre 4 e 5×10^5 céls/cm² (células por centímetro quadrado). Maiores quantidades de células podem ser obtidas também com a utilização de microcarregadores, pois essa tecnologia

permite a utilização de plataformas de cultivo semelhantes às observadas em cultivos de células em suspensão, pois são realizados em biorreatores e apresenta, por isso, a vantagem de permitir a mensuração e o controle de parâmetros como pH e oxigênio dissolvido (D.O.).

Esses cultivos são incubados por 24 ou até 96 horas, antes da infecção viral, dependendo da concentração celular que será infectada e da temperatura de incubação ou até que haja a formação da monocamada (Meslin *et al.*, 1996).

1.4. Produção da vacina

1.4.1. Produção do inóculo viral

As culturas celulares são infectadas pela adição do inóculo viral a suspensão celular antes que essas células sejam subcultivadas em novos frascos ou após a formação da monocamada celular. O volume de inóculo viral utilizado é calculado para que seja obtida uma multiplicidade de infecção (MOI) ótima, a qual irá depender do tipo de substrato celular utilizado, do sistema de cultivo e do estágio de crescimento em que se encontra a cultura. Durante a replicação viral o meio de cultivo utilizado na etapa de crescimento celular é substituído por um meio de manutenção que não contém soro fetal bovino (SFB) e a temperatura de incubação pode variar entre 33-37°C, dependendo das características específicas de cada cepa viral (Meslin *et al.*, 1996).

A tabela 3 apresenta os principais vírus e células utilizadas na produção de vacinas rábicas para uso veterinário. Cada tipo de substrato celular requer a utilização de um inóculo viral específico, previamente adaptado ao substrato.

O produto viral obtido ao final do processo é constituído pelo meio de manutenção no qual estão suspensas as partículas virais. A colheita desse material é realizada durante o pico de produção, que corresponde ao momento no qual há um maior acúmulo de vírus no meio de cultura. Essa suspensão viral deve ser clarificada imediatamente para remoção dos debris celulares, quer seja por filtração em um conjunto de membranas sucessivas de 8, 3 e 1,2 µm ou mesmo por centrifugação (Meslin *et al.*, 1996).

Tabela 3. Vacinas veterinárias produzidas em culturas de células.

Tipo de vacina	Cepa viral	Substrato celular
Viva	ERA	Células de rim suíno
		Células de rim de hamster
		BHK-21
	Flury	Fibroblastos embrionários de galinha
		Células de rim de cão
		BHK-21
	SAD	Células de rim de cão
		Células de rim de hamster
		BHK-21
Inativada	CVS-11	Células de rim de hamster
		BHK-21
	PM	Nil-2
	PV	BHK-21

Fonte: Meslin *et al.*, 1996.

1.4.1.1. Vacinas vivas atenuadas

A suspensão viral, previamente clarificada, deverá ser diluída para que a dose final da vacina contenha a quantidade de vírus necessária para imunizar os animais alvo. A potência de vacinas vivas é expressa em unidades infectivas, geralmente PFU (plaque forming unit - unidade formadora de placa) ou LD50 (lethal dose 50% - dose letal 50%, geralmente em camundongos). Após a diluição, a vacina deve ser imediatamente liofilizada e congelada, com a utilização do excipiente protetor apropriado (albumina ou soro, por exemplo) (Meslin *et al.*, 1996).

1.4.1.2. Vacinas inativadas

Existem vários métodos para a inativação do vírus da raiva, como o tratamento com β -propiolactona (BPL), acetiltilenoimina (AEI) ou outras “iminas”, ou irradiação ultravioleta. Fenol e formaldeído não são recomendados, pois podem reduzir a imunogenicidade viral e apresentar toxicidade ou resíduos irritantes. A BPL é a substância mais utilizada, quase sempre na concentração de 1:4.000 e em meios

com o pH ajustado para valores superiores a 7,0. A BPL também inativa bactérias e outros possíveis vírus contaminantes, mas sem afetar a antigenicidade do vírus rábico (Meslin *et al.*, 1996).

Alguns métodos combinam a ação do calor e da BPL para assegurar a completa inativação viral e a total hidrólise do agente inativante. Após a inativação, dependendo do conteúdo antigênico, a suspensão viral pode ser concentrada por ultrafiltração em membranas semipermeáveis (com massa molecular relativa seletiva para 100.000). Um parâmetro preciso para se determinar a antigenicidade de uma suspensão viral é a quantificação, por ELISA ou imunodifusão radial, da glicoproteína presente na suspensão viral (Meslin *et al.*, 1996).

A suspensão viral pode ser liofilizada e congelada ou armazenada em forma líquida. No último caso, é recomendada a utilização de estabilizantes e a adição de adjuvantes antes da distribuição do produto em ampolas (Meslin *et al.*, 1996).

1.5. Recomendações de uso e principais parâmetros de produção para vacinas rábicas veterinárias

1.5.1. Vacinas vivas atenuadas

A produção de vacinas vivas para uso veterinário é menos complexa do que a de vacinas inativadas. As técnicas de produção aplicadas na produção de vacinas vivas são mais simples e os volumes de cultura celular bastante reduzido. Os baixos custos de produção das vacinas vivas tornam essa apresentação a mais indicada para a produção em países em desenvolvimento, porém há diversas desvantagens que devem ser levadas em consideração, são elas:

Cepas virais atenuadas podem apresentar traços de patogenicidade, a qual irá variar de uma espécie animal para outra e também depender da via de aplicação e da dose utilizada. A patogenicidade residual está associada, principalmente, as vacinas preparadas com a cepa LEP Flury, ERA e SAD do vírus rábico. Essas vacinas são estritamente contraindicadas para filhotes de cães e gatos e para animais que apresentem estado físico debilitadas.

Vacinas vivas são estáveis apenas em condições rigorosamente controladas de armazenagem e uso, mesmo quando liofilizadas e congeladas (Meslin *et al.* 1996).

1.5.2. Vacinas inativadas

Vacinas inativadas produzidas em cultura de células para uso veterinário apresentam segurança e alta eficiência. Essas vacinas já provaram serem as mais indicadas para a imunização maciça de carnívoros domésticos e bovinos (Meslin *et al.*, 1996).

Em cães, as vacinas inativadas que utilizam hidróxido de alumínio como adjuvante conferem imunidade por mais de três anos após uma única aplicação. Para obter essa alta potência, porém, é essencial a seleção de um sistema de cultivo altamente produtivo, além do estabelecimento de protocolos de produção que garantam essa alta produtividade e que conservem a antigenicidade viral ao longo dos diversos estágios de produção (Meslin *et al.*, 1996).

1.5.3. Testes de controle

A potência das vacinas inativadas destaca-se entre os demais testes de controle de produção. Ainda que métodos *in vitro* para a determinação do conteúdo antigênico forneçam uma boa estimativa da potência durante a produção, eles não podem substituir os testes *in vivo* aplicados ao produto final. Cada lote de vacina deve ser testado pelo teste NIH e deve apresentar potência mínima de 1,0 UI (Unidade Internacional) por dose. Além disso, vacinas em fase de licenciamento devem ser submetidas a testes que avaliem a duração da imunidade na espécie alvo e esta deverá persistir ao menos por um ano (WHO, 1994; Meslin *et al.*, 1996).

É difícil encontrar em um único teste todos os parâmetros necessários para avaliar satisfatoriamente diferentes tipos de vacina rábica inativada. O teste de potência NIH foi desenvolvido originalmente pelos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos (NIH – National Institutes of Health) e em 1953 foi adotado como teste padrão, pelo seu país de origem, para dosagem da potência de vacina rábica

inativada, posteriormente sendo exigido também pela Organização Mundial de Saúde (OMS-WHO) (Barth, Diddrich e Weinmann, 1988).

1.6. Liofilização

Liofilização pode ser facilmente definida como a secagem de uma substância previamente congelada por sublimação, ou seja, remoção de qualquer solvente presente no estado sólido diretamente para o gasoso, sem passar pelo estado líquido, sendo que na maioria das formulações, o solvente presente é a água (Pitombo, 1989).

Existem muitas explicações sobre como o fenômeno da liofilização foi inicialmente observado ou utilizado. No começo, a liofilização era importante na conservação de um produto muito precioso, o alimento. Diferentes povos ao redor do mundo se beneficiaram desta técnica para preservar seu alimento, vikings, esquimós, incas entre outros, utilizaram-se das condições geográficas e climáticas, associando temperatura à altitude (pressão) para sua realização (Constantino e Pikal, 2004). Pouco a pouco, o homem aperfeiçoou o processo e o utilizou para diferentes propósitos, em 1903, Vansteenberghe já tinha uma visão bastante avançada para a época, pois pensando em melhorar o transporte a longas distâncias, liofilizou o vírus da raiva através de uma aparelhagem bastante arcaica, e constatou que o vírus rábico seco conservava a sua virulência por um longo período, além de ser facilmente diluído. Mais recentemente, a liofilização avançou a ponto de ser uma prática comum não só a alimentos (Pitombo e Lima, 2003), mas para produtos farmacêuticos (Tattini *et al.*, 2005), biomateriais (Leirner, Tattini Jr e Pitombo, 2009; Pitombo, 2007) e particularmente os biofármacos (Soares *et al.*, 2002).

O advento da liofilização industrial moderna pode ser ligado à necessidade de produção em larga escala de plasma sanguíneo e vacinas com maior estabilidade e tempo de validade (Constantino e Pikal, 2004).

A liofilização fornece uma alternativa de estabilidade, potencialmente mais robusta. No estado seco, em geral, a estabilidade de uma proteína aumenta, pela redução da mobilidade molecular e pelo retardamento das reações de deterioração mediadas pela água.

O processo de liofilização consiste basicamente em três estágios. O primeiro é o congelamento que envolve a aquisição de uma matriz sólida. O segundo estágio, a secagem primária, é aquele onde a sublimação ocorre por meio da redução da pressão dentro da câmara de liofilização. Quando toda a água livre congelada for removida por sublimação, encerra-se a secagem primária. O terceiro e último estágio da liofilização, chamado de secagem secundária ou dessorção, no qual a água congelada ligada é removida por aumento da temperatura até que o produto alcance a umidade residual desejada (Chang e Patro, 2004).

A primeira etapa e a mais importante para o desenvolvimento de um ciclo de liofilização é a caracterização térmica da formulação. Conhecendo a formulação é possível desenvolver um processo de liofilização com raciocínio científico ao invés de simplesmente tentativa e erro (Wang, 2004).

Em geral, a otimização do ciclo de liofilização é destinada a acelerar a sublimação (secagem primária), que é o passo mais longo de todo processo. Annealing é um tratamento térmico que ocorre durante a etapa de congelamento, onde o produto já congelado é mantido a uma temperatura específica por um tempo determinado, geralmente essa temperatura é mais elevada que a de congelamento e encontra-se entre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura de fusão do produto. Após esse tratamento térmico, o produto é novamente resfriado até a temperatura de congelamento onde é mantido por um tempo determinado, posteriormente seguindo normalmente as etapas de secagem primária e secundária. Com a utilização dessa técnica é possível homogeneizar o tamanho dos cristais de gelo (recristalização), elevando a T_g , minimizando o tempo de secagem primária e facilitando a reconstituição do produto liofilizado, devido a fácil penetração do diluente entre os canais deixados pela sublimação dos grandes cristais de gelo (Searles, Carpenter e Randolph, 2001).

A liofilização é uma técnica que oferece diversas vantagens ao processo de produção de biofármacos. É difícil imaginar como várias moléculas lábeis poderiam ser conservadas ao final do processo se tal técnica não estivesse disponível (Borgognoni, Polakiewicz e Pitombo, 2008).

A primeira e talvez mais importante vantagem do processo seja a habilidade de secar o produto mantendo sua estrutura original e atividade biológica (Pitombo *et al.* 1994). As demais seriam: a facilidade de reconstituição (solubilidade), aumento

da vida de prateleira, dosagem acurada e reproduzível e a possibilidade de manter a esterilidade do produto (Murgatroyd, 1997).

Liofilização não é um procedimento rápido, seus estágios dificilmente ocorrem em menos de um dia (24h), sendo o processo, geralmente realizado em bateladas e não continuamente. Para justificar o custo operacional do equipamento, energia dispensada e manutenção, essa técnica é restrita a produtos distribuídos em unidades de volume relativamente pequeno e de alto valor agregado (Pitombo, 2005).

Uma vacina liofilizada, em comparação a uma líquida, possui inúmeras vantagens, tais como: a melhora na estabilidade do produto às variações de temperatura aumentando sua vida de prateleira, possibilitando uma melhor logística do produto aos locais onde o acesso à rede refrigerada é difícil.

Do acima exposto, fica claro, que devida as suas condições geográficas e geopolíticas, tal estratégia também pode ser muito bem utilizada para o Brasil.

Analisando-se uma listagem de biofármacos tais como peptídeos, proteínas, vacinas virais, bacterianas e oligonucleotídeos, aprovados entre 1998 e 2004 pelo Food and Drug Administration (FDA - Órgão administrador americano responsável pela fiscalização e liberação de alimentos e medicamentos), observa-se que 46% dos novos produtos do mercado americano são liofilizados, portanto, a liofilização representa atualmente, para os EUA a mais importante estratégia de formulação. Em seguida com 32%, são biofármacos formulados como soluções aquosas. Suspensões aquosas representam 11% do total. Os 11% restantes dividem-se entre implantes, formas em cápsulas biodegradáveis (depósito *in situ*), produtos tissulares. Têm-se ainda as formas orais tais como cápsulas e comprimidos. Por fim, outras formas farmacêuticas tais como géis, emulsões e cremes (CDER, 1998-2004).

As características esperadas dos liofilizados obtidos serão: retenção da atividade, facilidade de reconstituição, longo tempo de vida de prateleira, dosagem exata, esterilidade, todas as operações em acordo com os assuntos regulatórios.

1.7 Excipientes

Certamente o principal motivo que leva a adição de excipientes em formulações de biofármacos é a tentativa de manter sua integridade durante o congelamento, a secagem e seu armazenamento.

Excipientes que promovem estabilidade generalizada a produtos liofilizados podem ser divididos em crioprotetores e lioprotetores, dependendo se a proteção ocorrer durante o congelamento ou secagem, respectivamente.

Um excipiente pode facilmente ser definido como qualquer componente que esteja presente, intencionalmente ou não, em um biofármaco, com exceção do componente ativo.

A maior parte dos biofármacos liofilizados, quando reconstituídos, necessita manter-se em pH neutro. Uma variedade de soluções tampões pode ser utilizada para essa finalidade: tampão citrato de sódio, tampão fosfato de sódio e tris.

Alguns excipientes são adicionados com a intenção de melhorar a estabilidade do produto. Os polióis, como a sacarose, maltose, lactose, trealose e manitol, agem como lioprotetores, ao se ligarem por meio de pontes de hidrogênio com as proteínas no estado sólido, formando uma matriz vítrea, que preenche o espaço deixado pela retirada da água, impedindo a degradação protéica por agregação, por exemplo.

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero geralmente utilizado como estabilizante, atua como crioprotetor, sendo o 3350 o mais utilizado, apesar de outros com diferentes massas moleculares também serem utilizados.

Um exemplo de produto que utiliza tanto crioprotetores bem como lioprotetores é o Venoglobulin[®]-S (Imunoglobulina G humana) que contém PEG e sorbitol.

Para prover proteção ao produto no estado seco, o açúcar estabilizante deve manter-se no estado amorfo na mesma fase que a proteína. Açúcares cristalinos mesmo após a liofilização, como o manitol, além de estabilizantes atuam como excipientes inertes. Proteínas, como gelatina e albumina também são utilizadas como agentes estabilizantes de biofármacos. Apesar de a albumina ser amplamente utilizada em diferentes formulações, entre elas vacinas, existe uma preocupação

crescente em relação à transmissão indireta de vírus, e mais recentemente descoberto, príons aos humanos e animais.

Outra classe de excipientes menos utilizada são os antioxidantes, que atuam como eliminadores de radicais livres ou como agentes redutores. Normalmente os produtos liofilizados são selados sob atmosfera de um gás inerte (argônio, nitrogênio) para impedir a ação oxidante do oxigênio em contato com a pastilha seca, mas em alguns casos além dessa medida é necessária a adição de ácido ascórbico, como por exemplo, na vacina viva contra o tifo (Vivotif Berna[®]).

Muitas proteínas são susceptíveis a ligação, desnaturação e agregação entre suas interfaces hidrofóbicas. A presença de surfactantes na formulação atenua essa situação competindo pela ligação. Em biofármacos liofilizados, o acréscimo de surfactantes, tais como polisorbato 20 e 80, pode ser útil para minimizar a degradação protéica durante a distribuição do produto em frascos, o congelamento e a reconstituição.

Os excipientes inertes são utilizados para dar elegância farmacêutica à pastilha liofilizada e se fazem necessários em biofármacos que requerem baixas doses por frasco e conseqüentemente pouca massa. Manitol é o excipiente mais utilizado para tal finalidade, outros exemplos são o sorbitol, dextrana e arginina.

A maioria dos excipientes inertes cristaliza quando congelados propiciando uma boa aparência à pastilha liofilizada. Em adição a um excipiente cristalino, às vezes adiciona-se um excipiente amorfo como estabilizante, resultando em um sólido com duas fases: a amorfa contendo o princípio ativo e o excipiente amorfo (ex. sacarose) e a cristalina contendo o agente inerte que criará volume.

Biofármacos que se apresentem como multidose no mesmo frasco podem ter acrescido em sua formulação antimicrobiana ou agente conservantes, no caso de vacinas o mais amplo é o timerosal, seu uso, porém, está diminuindo devido à preocupação em relação ao mercúrio contido e seu potencial tóxico (Constantino, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar as estratégias do processo para a conservação da potência da vacina rábica de uso veterinário em cultura de célula por liofilização.

2.2. Específico

Os seguintes parâmetros são imprescindíveis para determinar e controlar a qualidade de cada lote de vacina liofilizada produzido, sendo possível classificá-los esquematicamente em três grupos:

I) A qualidade da vacina antes da secagem:

- A potência inicial da vacina;
- A composição do substrato liofilizado;
- A proporção de substrato e ingrediente ativo.

II) O processo de liofilização:

- Congelamento;
- Secagem primária;
- Secagem secundária.

III) As condições que envolvem o armazenamento da vacina liofilizada:

- As características dos itens de envase, especialmente as rolhas;
- A umidade residual da vacina liofilizada;
- A atmosfera presente no momento do fechamento dos frascos;
- A temperatura de armazenamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Vacina

A célula utilizada foi a BHK₂₁ (Baby Hamster Kidney – Rim de hamster neonato), clone C₁₃, CCL-10 da ATCC® (American Type Culture Collection).

O vírus rábico utilizado foi a cepa Pasteur padronizada (PV) proveniente do Instituto Pasteur de Paris e mantida em banco de vírus trabalho a -80°C no LEPDIV (Laboratório Especial Piloto de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos Veterinários) do Instituto Butantan.

O controle da vacina rábica para uso veterinário obedece à portaria ministerial nº 228 de 25 de outubro de 1988, essa portaria determina a especificidade mínima da vacina, como a sua pureza, inocuidade e determinação de potência (no qual se utiliza hoje o método NIH e não mais o Habel). No entanto, essa portaria não determina como a vacina é produzida, logo os critérios e as etapas de produção seguiram os procedimentos operacionais padrões (POP) do LEPDIV-IBu.

3.1.2. Lioprotetores/ Crioprotetores/ Aditivos/ Excipientes

Os excipientes e suas diferentes concentrações utilizadas nas formulações da VRI liofilizada encontram-se exemplificados na tabela 4.

Tabela 4. Lista dos excipientes utilizados na formulação da VRI liofilizada em microplaca e suas diferentes concentrações.

Excipiente		Concentração Alta (a)	Concentração Média (b)	Concentração Baixa (c)
1	L-Glutamato de Sódio	0,5%	0,25%	0,1%
2	L-Asparagina	0,5%	0,25%	0,1%
3	L-Arginina	0,5%	0,25%	0,1%
4	Glicina	0,5%	0,25%	0,1%
5	Gelatina	0,5%	0,25%	0,1%
6	Dextran-40	0,5%	0,25%	0,1%
7	PEG 3350	0,5%	0,25%	0,1%
8	PEG 6000	0,5%	0,25%	0,1%
9	Manitol	2%	1%	0,5%
10	Sacarose	2%	1%	0,5%
11	Lactose	2%	1%	0,5%
12	Maltose	2%	1%	0,5%
13	Trealose	2%	1%	0,5%

3.2. Métodos

3.2.1. Culturas celulares

As células BHK₂₁ C₁₃ utilizadas neste trabalho foram mantidas em meio Eagle MEM (Minimum Essential Medium) modificado com sais de Earle, suplementado com 10% (cultivo celular) e 2% (produção viral) de SFB (Soro Fetal Bovino), ambos Cultilab[®].

Sendo cultivadas a partir do descongelamento de um criotubo do banco de células trabalho (BCT) e a partir daí sucessivos subcultivos foram realizados para escalonamento celular de acordo com a área e número de células por frascos, utilizando-se a proporção de $2,5 \times 10^4$ célula/cm².

Iniciando-se o descongelamento em frascos de 25 cm² e passando para 75 cm², 175 cm², 300cm² (figura 3) e finalmente em garrafas roller de vidro borosilicato (figura 4) cuja área disponível para cultivo foi estimada em 1250 cm² (VITRO®).

Durante os repiques, as células foram desprendidas da superfície dos frascos por meio da lavagem com solução de associação de tripsina e versene (ATV).

3.2.2. Contagem celular

Para a contagem do número de células viáveis foi utilizado corante azul de tripan em câmara de Neubauer (hematocitômetro).

Figura 3. Vista dorsal (A) e lateral (B) de frascos T, com células em cultivo, de diferentes tamanhos de área e utilizados para o cultivo estático de células BHK₂₁ (Marcas: TPP® – tampa amarela, Nunc® – tampa azul e Falcon® – tampa branca).

Figura 4. Estante rotatória (Bellco®) para cultivo de células em garrafas roller dentro de estufa microbiológica (FAE system®) (A), garrafas roller de vidro borossilicato (1250 cm²) (B).

3.2.3. Inoculação de vírus rábico em células BHK21

A inoculação do vírus rábico foi realizada conforme Procedimento Operacional Padrão (POP) do LEPDIV-IBu.

A inoculação viral foi realizada com o procedimento de produção em monocamada, com inóculo viral com título de $10^{4,5}$ FFD₅₀ (fluorescence focus dose 50% - dose de foco fluorescente 50%). Utilizamos um MOI (multiplicity of infection – multiplicidade de infecção) de 0,07; sendo o MOI a razão entre a quantidade de partículas virais infectantes (em mL) para o número de células sendo infectadas (em mL). As garrafas roller inoculadas foram incubadas em estufa a 34°C sob estante rotatória por 2 horas para adsorção viral, sendo posteriormente completadas para o volume final de 400 mL com meio MEM suplementado a 2% de SFB.

O cálculo do volume de inóculo de vírus rábico foi realizado segundo a fórmula:

MOI x nº de células totais da suspensão
Volume do inóculo viral (mL) = _____
(antilog do título do inóculo em FFD₅₀ ÷ 0,05)

Figura 5. Fórmula para cálculo do volume de inóculo viral utilizado.

As colheitas dos sobrenadantes foram realizadas após 72 e 96 horas de incubação, respectivamente. A suspensão viral foi clarificada em membrana de porosidade absoluta 0,45 µm.

Neste lote específico, não houve a necessidade da etapa de concentração viral por filtração tangencial, devido à utilização de um inóculo com alto título viral e ao volume final reduzido (2 L).

3.2.4. Purificação da suspensão viral

O DNA residual e debris (BHK-21) celulares foram retirados em uma operação de adsorção em DEAE (Dietilaminoetil) celulose (20% de suplementação) sob agitação lenta em câmara fria durante 15 minutos. A separação da suspensão viral purificada deu-se por sedimentação e filtração clarificante do sobrenadante.

3.2.5. Inativação viral

A suspensão viral purificada foi inativada por meio da adição de uma solução diluída (1:10) de betapropiolactona sendo que a concentração final na suspensão viral purificada foi de 1:4.000. A suspensão ficou incubada em câmara fria por 24 h e logo após em estufa a 37°C por 2h, ambas as operações sob agitação.

Figura 6. Etapas do processo de produção da VRI.

3.2.6. Dosagem de potência da vacina rábica inativada - Teste NIH (National Institutes of Health)

Trata-se do teste preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para determinação da potência da vacina rábica inativada de uso veterinário. É um teste realizado em camundongos com duração de 28 dias (Selligmann Jr. 1973; Wilbur e Aubert, 1996).

Os animais serão utilizados para determinação da potência da vacina rábica inativada para utilização e correlação em ensaios *in vitro* (ABT – Antibody Binding Test / teste de ligação do anticorpo), posteriormente realizados para determinação da potência das vacinas liofilizadas.

3.2.7. Imunização dos coelhos para obtenção de IgG antirrábica purificada

Os animais foram inoculados por via interdigital (Cohen e Thorbecke, 1964) com vacina rábica inativada, adsorvida ao hidróxido de alumínio (AlOH) a 5% e saponina a 140ug/mL. Foram aplicadas quatro doses da vacina com intervalos de 15 - 7 - 7 dias. Após a 3ª dose, uma amostra de sangue foi retirada da veia marginal do pavilhão auricular externo dos três coelhos para dosagem de anticorpos pelo método *in vitro* RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test – teste rápido de inibição do foco fluorescente). Após uma semana da última dose, os animais foram sangrados por punção cardíaca sob efeito de anestesia, foi colhida amostra individual para dosagem do título de anticorpos pelo RFFIT, porém foi feito um “pool” com o soro dos três, filtrado em membrana 0,22µm e congelado em freezer -20°C.

3.2.8. Teste rápido de inibição do foco fluorescente RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test)

A base da técnica utilizada encontra-se descrita por Smith, Yager e Baer (1996) e modificada por Moura *et al* (2008). O esquema exemplificando o procedimento encontra-se na figura 7.

TESTE DE RFFIT (Rapid fluorescent focus inhibition test)

1- Fazer diluições seriadas da amostra de soro a ser testada e do soro referência

2- Acrescentar uma quantidade fixa de vírus rábico CVS (100 DFF₅₀) e incubar a 37 °C / 90'

3- Acrescentar $3,7 \times 10^4$ células BHK-21 / orifício e incubar a 37 °C / 22 horas.

4- Fixar as células e marcar com conjugado anti-nucleocapsídeo rábico com fluoresceína

Anticorpo

Vírus rábico

Vírus neutralizado

Fluorescência

Figura 7. Etapas do RFFIT para dosagem de potência do soro antirrábico.

3.2.9. Purificação do soro dos coelhos com ácido caprílico para obtenção da IgG antirrábica purificada

Técnica baseada na descrita por Santos *et al.* em 1989, com a diferença de que antes de realizarmos a diálise (por ultra filtração em tubo Amicon® de 50kDa), normalizamos o pH a 7,5 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1N.

3.2.10. Doseamento de proteína da IgG purificada para o coating da placa de ELISA

O teor de proteína da IgG purificada foi determinado para a padronização da concentração de 2 µg de IgG por poço da placa.

3.2.11. Dosagem de proteína pelo método de Bradford

Foi utilizado o microensaio em microplacas, sendo o que o limite linear previsto é de 8,0µg/ml a aproximadamente 80 µg/ml. Mediu-se a absorbância a 595 nm em espectrofotômetro para leitura de microplacas (Power Wave XS2 da Biotek), (Bradford, 1976).

3.2.12. Estabelecimento das concentrações ideais da IgG purificada e da VRI para realização do teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ensaio imunoenzimático)

Determinada a concentração de proteína da IgG de coelho purificada pelo método de Bradford, para atingir a concentração desejada de 20µg/mL (2µg/poço), distribui-se 100µL por poço, com exceção da coluna 1 de A-H em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 a 0,01M e incubou-se a temperatura de 2° a 8°C durante 18 horas (overnight). Em seguida preparou-se o tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 com 0,5% de gelatina para realização de bloqueio da placa. Adicionou-se 100µL por poço (menos na coluna 1 do A ao H – Branco), incubou-se a temperatura de 37°C por 2 horas.

Após a etapa do bloqueio, colocou-se 100µL em todos os poços (com exceção da coluna 1 do A ao H – Branco) de PBS pH 7,2 + 0,05% de gelatina.

Adicionou-se 100µL de vacina rábica inativada na linha A, das fileiras 2 a 12. Realizaram-se diluições seriadas 1:2 horizontalmente das linhas de A ao H, passando 100µL para o poço seguinte e desprezando 100µL no final. Sendo que o volume final nos poços foi de 100µL. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas para que a reação de ligação do anticorpo (IgG purificada do coelho) e vírus (da vacina rábica) acontecesse.

Após a adição do antígeno viral, adicionou-se 100µL em todos os poços (com exceção da coluna 1 do A ao H – Branco) de PBS pH 7,2 + 0,05% de gelatina. E foram acrescentados 100µL de soro antirrábico equino na coluna 2, do A ao H. Realizaram-se diluições seriadas 1:2 verticalmente das colunas de 2 a 12, passando 100µL para o poço seguinte e desprezando 100µL no final. Sendo que o volume final nos poços foi de 100µL. Incubaram-se a 37°C por 1 hora para que a reação de ligação do anticorpo (IgG eqüina) e vírus (da vacina rábica) acontecesse.

Foi diluído a 1:10.000 o anticorpo de coelho anti-IgG eqüina conjugada a peroxidase (Sigma®) em PBS pH 7,2 + 0,05% de gelatina. Adicionou-se 100µL por poço e incubou-se a 37°C por 1 hora.

Em seguida foram adicionados 100µL da solução de OPD a 0,02% (ortofenil diaminoamina) + H₂O₂ em tampão citrato pH 5,5, sendo incubada a temperatura ambiente sob proteção da luz até a mudança de coloração amarela das amostras. A reação foi interrompida com 50 µL por poço de ácido sulfúrico a 4N.

Cada etapa do procedimento foi intercalada pela lavagem da placa com tampão PBS tween a 0,05%.

As placas foram submetidas à leitura da absorbância com filtro de 492 nm em espectrofotômetro para leitura de microplacas (Power Wave XS2 da Biotek).

O esquema exemplificando a técnica do ELISA utilizada encontra-se na figura 8.

Figura 8. Etapas do ELISA para verificação da perda ou manutenção da antigenicidade da VRI e de suas diversas formulações após o processo de liofilização.

3.2.13. Liofilização em microplaca

Os ensaios realizados para a escolha da melhor formulação (VRI + excipiente) foram baseados na técnica descrita por Grant, Matejtschuk e Dalby (2009), a qual propõe uma técnica rápida, auxiliando na triagem para a otimização de formulações protéicas liofilizadas.

Algumas microplacas próprias para a cultura de células (com baixa adesão de proteínas) foram adaptadas para realizar a liofilização de diferentes formulações da vacina com os excipientes e suas concentrações (tabela 4), com esta técnica foi possível repetir mais vezes o teste para confirmar o resultado e ainda assim despendar pouca amostra.

A adaptação realizada permitiu que o fundo dos poços da microplaca entrasse em contato direto com a prateleira do liofilizador. A liofilização foi realizada em um liofilizador FTS Systems, modelo TDS-00209-A, microprocessado. O volume final de amostra por poço foi 200 μ L sendo utilizados os seguintes parâmetros durante o processo de liofilização: congelamento a -40°C por 120 minutos, sublimação com temperatura a -40°C por 600 minutos, porém pressão reduzida (vácuo) de 75 mTorr (mili Torr) e por fim secagem secundária com 20°C por 300 minutos a 75 mTorr.

Os poços foram parcialmente fechados com rolhas butílicas também adaptadas impedindo a perda do produto durante o processo.

Para ressuspender a vacina após o término do ciclo, foi adicionado 200 μ L de água purificada, sendo transferidos 100 μ L para a placa de ELISA no momento de colocar a amostra da vacina. Como controle na liofilização, a vacina foi liofilizada sem adição de excipiente algum e na placa do ELISA, além desse controle, também foi adicionada a vacina em sua forma líquida sem ter sofrido o processo de liofilização.

3.2.14. Análise estatística – Regressão de dados categóricos

A análise estatística foi realizada no programa SPSS® v.17, aplicando análise de regressão para dados categóricos. Foram avaliadas as médias dos testes de ELISA das formulações para triagem dos excipientes que “melhoraram” a antigenicidade da VRI.

A vacina liofilizada sem adição de excipiente foi utilizada como a variável dependente a ser comparada com as demais formulações.

3.2.15. Microscopia ótica acoplada à liofilização

A temperatura de colapso da VRI foi determinada através de um microscópio acoplado a um módulo de liofilização, Lyostat 2, modelo FDCS 196, Linkam Instruments, Surrey, UK, equipado com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). A pressão utilizada durante as análises foi de 100 mTorr através de uma bomba de vácuo (Edwards E2M1.5, Linkam) e monitorada através de uma válvula Pirani. A calibração foi feita com soluções aquosas de NaCl (temperatura eutética de $-21,1^{\circ}\text{C}$). A amostra foi colocada em uma placa de quartzo de 16 mm, coberta também por quartzo (Linkam) para minimizar gradientes térmicos. A amostra foi congelada até -100°C e a pressão do sistema reduzida. A observação direta do congelamento e liofilização foi feita utilizando-se um microscópio de luz polarizada Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão).

3.2.16. Análise térmica das diferentes formulações da vacina rábica inativada e dos excipientes

As curvas de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas através de um equipamento da marca Shimadzu, modelo DSC 60 cell, utilizando-se recipientes (cadinhos) de alumínio contendo aproximadamente 20 mg de amostra. As análises foram conduzidas sob pressão dinâmica de nitrogênio de 50 mL min^{-1} e submetidas a um programa de aquecimento e resfriamento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ com temperatura inicial de 25°C até temperatura final de -80°C . O equipamento foi

calibrado usando-se Índio (In+) (temperatura de fusão de 156.6°C; Energia entálpica de fusão ($\Delta H_{fus.}$) = 28.54 J g⁻¹).

3.2.17. Liofilização em frasco ampola

Após o resultado das melhores formulações da VRI, o processo de liofilização foi realizado utilizando as mesmas formulações em frasco ampola, após a determinação das seguintes temperaturas: T_c (temperatura de colapso), T_{cr} (temperatura de cristalização), T_g (temperatura de transição vítrea), T_e (temperatura eutética) e T_f (temperatura de fusão) através de análise em DSC (Calorimetria exploratória diferencial) e microscopia ótica acoplada à liofilização (Lyostat) para determinação dos parâmetros de liofilização. O teste para controle do processo de liofilização no quesito manutenção da potência, nesse caso, foi o teste de ligação do anticorpo modificado (ABT).

3.2.18. Teste de ligação do anticorpo modificado - Antibody-binding test (ABT)

A base da metodologia utilizada foi descrita por Arko, Wiktor e Sikes em 1973 e posteriormente por Barth em 1996.

Trata-se de um teste *in vitro* para quantificar a antigenicidade em Unidades Internacionais (UI) de uma vacina rábica inativada, mais rápido em comparação aos testes *in vivo* e comumente utilizado como teste de controle de processo.

Este teste foi realizado na etapa final do trabalho onde a liofilização das formulações da VRI foi realizada em frasco ampola, mantendo a esterilidade do produto.

O esquema exemplificando a técnica utilizada no teste apresenta-se na figura 9.

TESTE DE ABT (Antibody Binding Test)

1- Fazer diluições seriadas da amostra de vacina a ser testada e da vacina referência

2- Acrescentar uma quantidade fixa de soro anti-rábico (0,2 UI/mL) e incubar a 37 °C / 90'

3- Acrescentar uma quantidade fixa de vírus rábico CVS (100 DFF₅₀) e incubar a 37 °C / 90'

4- Acrescentar $3,7 \times 10^4$ células BHK-21 / orifício e incubar a 37 °C / 22 horas.

5- Fixar as células e marcar com conjugado anti-nucleocapsídeo rábico com fluoresceína

Antígeno
 Anticorpo
 Vírus rábico
 Vírus neutralizado
 Fluorescência

Figura 9. Etapas do ABT para dosagem de potência da vacina rábica.

3.2.19. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada na central analítica do Instituto de Química da USP, com o Microscópio JSM–7401F (JEOL Ltda) utilizou-se tensão de aceleração de 1kV e aumentos de 500, 7.500 e 15.000 vezes para análise da estrutura da pastilha liofilizada.

3.2.20. Determinação do conteúdo de umidade

A umidade residual da VRI com PEG3350 0,5% liofilizada foi determinada no analisador de umidade Computrac Vapor Pro RX (Arizona Instruments), em temperatura constante de 100 °C.

3.2.21. Isotermas de adsorção de umidade

Muitas das operações unitárias usadas no processamento de fármacos e produtos biológicos têm como objetivo, de uma maneira ou outra, a remoção da água ou inibição de seus efeitos para se obter a estabilização do material.

O principal e essencial meio para a medição da imobilidade da água é através da função que existe entre teor de umidade (W) e atividade de água (A_w). A atividade de água é definida como sendo o quociente entre a pressão de vapor da água presente no produto (P) e a pressão de vapor da água pura (P_o), na mesma temperatura. A seguinte equação define esta relação, apresentando também o conceito de umidade relativa de equilíbrio (W_e):

$$A_w = \frac{P}{P_o} = \% \frac{W_e}{100}$$

Baseado no conceito termodinâmico de potencial químico da água, A_w é utilizada como um índice de quão satisfatoriamente está sendo feito o controle do comportamento da água em um produto (Labuza, 1984), bem como é o parâmetro que controla a força motora em operações de remoção de água sendo, portanto, essencial ao planejamento de processos (Ginsburg, 1981). A atividade de água

caracteriza o estado da água em um material, ou seja, é uma medida da disponibilidade da água para promover alterações físicas, químicas ou biológicas.

O estudo do comportamento higroscópico de produtos liofilizados pode ser feito com o auxílio de isothermas de sorção de umidade. As isothermas de sorção podem ser definidas como curvas que relacionam a pressão parcial do vapor de água nos alimentos com seu conteúdo de umidade a uma determinada temperatura. As isothermas permitem estimar a força de ligação das moléculas de água em relação ao sólido no qual se encontram sorvidas.

O final de uma secagem é em geral determinado pela atividade de água desejável ao produto acabado (Iglesias & Chirife, 1976 a, b; Kapsalis, 1981, 1986). Isothermas de sorção de umidade combinadas com equações de transporte de massa, ou seja, equações do tipo força motora / resistência são utilizadas para predição do tempo de armazenamento baseados numa atividade de água crítica, em relação a algum atributo do alimento em um sistema definido de embalagem sob condições ambientes estabelecidas (Pitombo, 1998). O calor de sorção pode ser usado para estimar a energia necessária para a secagem do produto.

A equação BET foi primeiramente postulada por Brunauer, Emmett e Teller (1938). Esta equação pode se derivada de mecanismos cinéticos e estatísticos, como também de considerações termodinâmicas. A equação BET é:

$$W = \frac{W_m * C * A_w}{(1 - A_w) * [1 + (C - 1)A_w]}$$

sendo,

W , teor de umidade (g/ 100g m.s.)

W_m, teor de umidade na monocamada (g/ 100g m.s.)

C, constante relacionada ao calor de sorção

A_w, atividade de água do produto.

As isothermas BET mais utilizadas contêm atividades de água na faixa de 0,05 a 0,45, mas estas fornecem dados suficientes para que os parâmetros M_{bm} e B_{bt} possam ser calculados (Labuza, 1968). O conceito de monocamada é útil devido a sua relação com os vários aspectos físicos e químicos da deterioração em alimentos desidratados (Iglesias & Chirife, 1976). Além disto, o valor da monocamada do BET é um método bastante efetivo para se estimar a quantidade de água ligada a pontos

polares específicos nos produtos desidratados (Mclaren & Rowen, 1952; Duckworth & Smith, 1963).

Em um analisador de sorção de vapor de água, HydrosorbTM 1000, (Quantachrome Instruments, FL, EUA.), foram construídas curvas de adsorção da VRI liofilizada em diferentes temperaturas. Amostras de VRI liofilizada foram pesadas em balança analítica e depois colocadas no porta-amostra do equipamento, devidamente calibrado para cada temperatura estudada. O porta-amostra então foi acoplado ao equipamento, acionando o sistema de vácuo e assim permaneceu por mais de 12 horas envolto em uma manta à temperatura de 60°C. Após esse período de 12 h, a amostra foi novamente pesada e a manta substituída por um banho em diferentes temperaturas com agitação. Sob vácuo, traçamos as isotermas de adsorção, condicionando as amostras a diferentes pressões de vapor, estabelecidas por 20 pontos escolhidos de umidade relativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção da VRI

O volume final do lote de VRI produzido foi de 2L, o suficiente para a realização dos testes de liofilização e suas repetições. A escolha do método de produção em garrafas roller deveu-se ao baixo volume necessário.

A propagação de vírus em monocamada tem sido utilizada com sucesso para a produção de vacina, em frascos estacionários ou em sistemas com agitação, do tipo spinner e biorreatores, neste caso necessitando o uso de micro carreadores associado ao cultivo (Gallegos Gallegos, 1995; Kallel *et al*, 2003; Jagannathan *et al*, 2009). A utilização do soro fetal bovino durante a replicação, mesmo que em quantidade reduzida (2%), parece proteger o vírus contra degradação térmica, mais propriamente que fornecer o ingrediente necessário a sua replicação (Wiktor, 1973).

As primeiras vacinas inativadas, produzidas em tecido nervoso de diferentes animais, apresentavam alto risco de reações adversas. A iniciativa da produção do vírus da raiva em ovos embrionados como alternativa ao tecido nervoso também não foi bem sucedida devido elevado teor protéico. Dentre as vacinas veterinárias existentes, a maioria utiliza a célula BHK-₂₁, devido ao alto rendimento alcançado e facilidade de manutenção (Chapman, Ramshaw e Crick, 1973; Larghi *et al*, 1976), outra célula bastante utilizada para a produção de vacina veterinária é a Nil-2 (fibroblasto de rim de hamster), porém nenhuma das duas é recomendada para produção de vacina de uso humano devido à heteroploidia e as características carcinogênicas dessas células.

4.2. Potência da VRI pelo NIH

A potência da VRI produzida para realização deste mestrado foi analisada pelo método NIH resultando em 3,5 UI / mL. O valor obtido mostrou-se 3 vezes acima do valor mínimo preconizado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

O teste de NIH tem se mostrado um método útil para dosagem da potência de vacinas inativadas. No entanto foram descritas algumas desvantagens observadas por inúmeros autores da área, tais como: (a) Os parâmetros com os quais o teste trabalha não são conhecidos, tido que os anticorpos neutralizantes não são os principais envolvidos na resistência ao desafio intracerebral; (b) O desafio intracerebral não reproduz a transmissão natural do vírus da raiva; (c) A cepa de vírus da raiva fixa, CVS, selecionada para o desafio intracerebral, demonstra patogênese e neurotropismo diferente da maioria das cepas de campo do vírus da raiva; (d) O método tradicional do teste utiliza duas doses de vacina com intervalo de uma semana entre elas. A dose reforço pode mascarar o resultado do teste; (e) As referências preparadas para serem utilizadas no teste NIH não foram testadas em humanos, não existe correlação satisfatória entre o valor antigênico avaliado pelo NIH e a formação de anticorpos neutralizantes para o vírus da raiva em animais e humanos; (f) O teste NIH é caro, longo (28 dias), utiliza um grande número de animais e emprega o vírus virulento (vivo) para desafio (CVS) (Wunderli *et al*, 2006; Baer, 1997).

O teste ainda é discutido em relação à grande variabilidade dos resultados obtidos, sendo as principais causas: (a) Tipo de vacina testada e a cepa utilizada para sua produção; (b) Utilização de diferentes preparações de referência; (c) O uso de diferentes linhagens de camundongos e condições de manejo diversificado; (d) O princípio da metodologia empregada, por exemplo, imunização intraperitoneal e desafio intracerebral; (e) Indivíduo que realiza as diluições e as inoculações nos animais; (f) Utilização de diferentes passagens da cepa CVS para desafio (Barth, Didderrich e Weinmann, 1988).

Como se já não fosse o bastante, outro problema foi observado com o teste NIH. A cepa CVS é derivada do vírus originalmente isolado por Pasteur em 1882, assim como a cepa PV (Pasteur vírus) e PM (Pitmann-Moore) responsáveis pela maior parte das vacinas inativadas produzidas tanto para animais como para humanos. Vacinas inativadas que não foram preparadas com cepa Pasteur ou suas derivadas (heterólogas) ficam em desvantagem em relação ao resultado do teste NIH em comparação às vacinas preparadas com cepas homólogas (Barth, Didderrich e Weinmann, 1988).

Crick e colaboradores (1981) ficaram surpresos quando uma vacina produzida com a cepa Flury LEP (Low Egg Passage – Baixa Passagem em Ovo Embrionado), com apenas uma dose protegeu os camundongos quando desafiados com a cepa desafio homóloga, repetiram o teste com a cepa desafio heteróloga (CVS) e o resultado foi totalmente contrário. Da mesma maneira, Gourlay, Bunn e Halverson, obtiveram resultados semelhantes testando uma vacina inativada produzida com a cepa SAD (Street Alabama Dufferin) (Barth, Diddrich e Weinmann, 1988).

Mesmo sendo o teste para dosagem de potência requerida pela WHO (OMS - Organização Mundial da Saúde) e OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), inúmeras tentativas estão sendo desenvolvidas na esperança de substituição do teste *in vivo* NIH por um teste *in vitro* (Gamoh *et al*, 2003, Wunderli *et al*, 2006). Como também o emprego dos 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement – Substituição, Redução e Aperfeiçoamento) em testes *in vivo* para detecção da potência da vacina inativada (Hendriksen, 2009, de Moura *et al*, 2009, Krämer *et al*, 2010).

4.3. Resultados de testes de RFFIT de amostras de soros de coelho e da IgG antirrábica purificada

Após realização da soroneutralização em células (RFFIT), as placas foram lidas em microscópio de fluorescência para contagem dos focos fluorescentes. Para cada poço foram lidos 10 campos, sendo considerados positivos quando apresentaram um ou mais focos fluorescentes e negativos quando não apresentaram.

Após a leitura completa da placa foi realizado o cálculo do título de anticorpos neutralizantes ou a dose formadora de focos fluorescentes em 50% dos campos inoculados (FFD₅₀) pelo método de Spearman-Kärber (tabela 5).

Tabela 5. Resultado do RFFIT das amostras de soro dos coelhos imunizados e da IgG purificada.

AMOSTRA	ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA RAIVA (UI/ML)		
	1º Teste	2º Teste	Média
Coelho 1	61		
Coelho 2	17		
Coelho 3	106		
Mistura de soros de coelhos (pool)	70	58	64
IgG de coelho purificada com ácido caprílico	101	91	96

4.4. Dosagem de proteína pelo método de Bradford

O reagente utilizado para este teste (figura 10) foi preparado conforme descrito por Bradford (1976) e sendo assim foi preciso determinar o intervalo das diluições do padrão que respondessem em uma função linear contra uma absorbância de 595 nm.

Conforme demonstrado na figura 11, esse intervalo de linearidade foi obtido entre as concentrações 5 e 60 mg / mL.

Estabelecida a curva padrão foi possível determinar as concentrações proteicas da IgG purificada e da VRI (tabela 6).

Figura 10. Foto do micro ensaio de Bradford em placas de micro titulação.

Figura 11. Dosagem de proteína da IgG purificada e da VRI.

Tabela 6. Resultado da dosagem de proteína da VRI e da IgG purificada pelo método de Bradford.

Amostra	Teor de proteína (mg / mL)
IgG purificada	9,9
VRI	0,6

4.5. Padronização do teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ensaio imunoenzimático)

Determinada a concentração proteica da IgG purificada, foi feito o coating do ELISA com 2µg de IgG por poço (20µg por placa), seguindo-se a técnica descrita no item 3.2.12.

A figura 12 mostra a finalização do teste imunoenzimático, onde o degrade da coloração está relacionado à concentração de antígeno (vírus presente na vacina rábica) das amostras. Após a leitura da absorbância, foram traçados os gráficos (figuras 13 e 14), para análise das diluições ideais da VRI e do soro antirrábico equino, que tornam as amostras das diferentes formulações da VRI liofilizadas detectável pelo teste de ELISA.

Figura 12. ELISA para determinação da concentração ótima de VRI e soro antirrábico equino.

Figura 13. Curva de absorbância das diluições seriadas da VRI.

Figura 14. Curva de absorbância das diluições seriadas do soro antirrábico equino.

A partir da análise dos resultados apresentados nas figuras 13 e 14 foi estabelecido que as diluições 1:8 de VRI e 1:128 de soro antirrábico equino foram as ideais para serem utilizadas no ELISA, por ser a maior diluição que não apresentou diferença significativa das diluições mais concentradas, o que permitiu maior sensibilidade ao teste para escolha da melhor formulação da vacina liofilizada.

4.6. Liofilização das diferentes formulações da VRI em microplaca

Ao total foram realizados com sucesso 5 processos completos, desde a formulação da VRI com os excipientes e sua distribuição nos poços das microplacas (figura 16), seu fechamento com as rolhas butílicas adaptadas (figuras 17), o processo de liofilização com as etapas de congelamento, secagem primária e secundária (figura 15), visualização e ressuspensão do produto liofilizado (figuras 18, 19 e 20) e verificação da antigenicidade pelo ELISA.

Com a utilização da técnica de liofilização em microplacas foi possível atingir o propósito esperado, ou seja, identificar as formulações, e seus respectivos excipientes, que tiveram um efeito positivo sobre a preservação da antigenicidade da vacina rábica durante o processo de liofilização.

Geralmente a escolha da melhor formulação liofilizada é um procedimento empírico que consome muito tempo em experimentos de liofilização além do uso de grandes quantidades de materiais. Porém ao adotar a liofilização em microplacas o tempo dispensado para obter os resultados foi mais rápido e utilizou-se pouca quantidade de amostra para realização e repetição dos testes.

Figura 15. Teste de liofilização da vacina em microplacas contendo diversas formulações de excipientes.

CT – Temperatura do condensador

CVAC – Pressão de vácuo na câmara

ST – Temperatura da prateleira

PT1 – Temperatura do produto no termopar 1

DWPT – Dew point (ponto de saturação do vapor de água)

quantidade de água que sai do produto em PPM

CV 2 – Pressão de vácuo do condensador

Figura 16. Distribuição das diferentes formulações da VRI + excipientes nas microplacas (placas de 1 a 3, da esquerda para a direita).

Figura 17. Fechamento das microplacas (com as diferentes formulações da VRI + excipientes) com rolhas butílicas no 1º estágio para permitir a saída do vapor (placas de 1 a 3, da esquerda para a direita).

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	Glutamato 0,5%	Glutamato 0,1%	Asparagina 0,25%	Arginina 0,5%	Arginina 0,1%	Glicina 0,25%	Gelatina 0,5%	Gelatina 0,1%	Dextran40 0,25%	VRI 1:8	PBS
PBS	Glutamato 0,5%	Glutamato 0,1%	Asparagina 0,25%	Arginina 0,5%	Arginina 0,1%	Glicina 0,25%	Gelatina 0,5%	Gelatina 0,1%	Dextran40 0,25%	VRI 1:8	PBS
PBS	Glutamato 0,5%	Glutamato 0,1%	Asparagina 0,25%	Arginina 0,5%	Arginina 0,1%	Glicina 0,25%	Gelatina 0,5%	Gelatina 0,1%	Dextran40 0,25%	VRI 1:8	PBS
PBS	Glutamato 0,25%	Asparagina 0,5%	Asparagina 0,1%	Arginina 0,25%	Glicina 0,5%	Glicina 0,1%	Gelatina 0,25%	Dextran40 0,5%	Dextran40 0,1%	VRI 1:8	PBS
PBS	Glutamato 0,25%	Asparagina 0,5%	Asparagina 0,1%	Arginina 0,25%	Glicina 0,5%	Glicina 0,1%	Gelatina 0,25%	Dextran40 0,5%	Dextran40 0,1%	VRI 1:8	PBS
PBS	Glutamato 0,25%	Asparagina 0,5%	Asparagina 0,1%	Arginina 0,25%	Glicina 0,5%	Glicina 0,1%	Gelatina 0,25%	Dextran40 0,5%	Dextran40 0,1%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Figura 18. Distribuição das amostras na microplaca 1 (à esquerda) e visualização das formulações após término do processo de liofilização (à direita).

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	PEG 3350 0,5%	PEG 3350 0,1%	PEG 6000 0,25%	Manitol 2%	Manitol 0,5%	Sacarose 1%	Lactose 2%	Lactose 0,5%	Maltose 1%	VRI 1:8	PBS
PBS	PEG 3350 0,5%	PEG 3350 0,1%	PEG 6000 0,25%	Manitol 2%	Manitol 0,5%	Sacarose 1%	Lactose 2%	Lactose 0,5%	Maltose 1%	VRI 1:8	PBS
PBS	PEG 3350 0,5%	PEG 3350 0,1%	PEG 6000 0,25%	Manitol 2%	Manitol 0,5%	Sacarose 1%	Lactose 2%	Lactose 0,5%	Maltose 1%	VRI 1:8	PBS
PBS	PEG 3350 0,25%	PEG 6000 0,5%	PEG 6000 0,1%	Manitol 1%	Sacarose 2%	Sacarose 0,5%	Lactose 1%	Maltose 2%	Maltose 0,5%	VRI 1:8	PBS
PBS	PEG 3350 0,25%	PEG 6000 0,5%	PEG 6000 0,1%	Manitol 1%	Sacarose 2%	Sacarose 0,5%	Lactose 1%	Maltose 2%	Maltose 0,5%	VRI 1:8	PBS
PBS	PEG 3350 0,25%	PEG 6000 0,5%	PEG 6000 0,1%	Manitol 1%	Sacarose 2%	Sacarose 0,5%	Lactose 1%	Maltose 2%	Maltose 0,5%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Figura 19. Distribuição das amostras na microplaca 2 (à esquerda) e visualização das formulações após término do processo de liofilização (à direita).

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	PBS	Trealose 1%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	PBS	Trealose 1%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	PBS	Trealose 1%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	Trealose 2%	Trealose 0,5%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	Trealose 2%	Trealose 0,5%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	VRI 1:8	PBS	PBS	Trealose 2%	Trealose 0,5%	VRI 1:8	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Figura 20. Distribuição das amostras na microplaca 3 (à esquerda) e visualização das formulações após término do processo de liofilização (à direita).

4.7. Análise estatística – Regressão de dados categóricos

Aplicando a análise de regressão para dados categóricos (tabela 7), foram avaliadas as médias dos resultados das 39 formulações (13 excipientes em suas três diferentes concentrações) para triagem das que “melhoraram” a antigenicidade da VRI, tendo sido utilizada como a variável dependente a ser comparada com as demais formulações a vacina (VRI) liofilizada sem adição de excipiente.

Adotando como menor valor de importância a glicina a 0,5% (-0,915) e o PEG 3350 a 0,5% (1,452) como o maior valor de importância, traçou-se uma reta e dividiu-se em 3, sendo que os valores de importância que se encontravam entre -0,915 e -0,126 foram consideradas formulações que resultaram em baixo “score” de antigenicidade em relação à VRI; os valores de importância compreendidos entre -0,126 e 0,663 como médio “score” de antigenicidade da VRI; e os valores de importância obtidos entre 0,663 e 1,452 como alto “score” de antigenicidade após a liofilização da VRI (figura 21).

Sendo assim a arginina 0,5%, o PEG 3350 0,5%, a sacarose 2%, a maltose 1% e a trealose 1% foram as formulações que deram melhores resultados, apresentando um alto “score” de antigenicidade em comparação à vacina liofilizada sem adição de excipientes durante o processo de liofilização em microplacas (tabela 8).

Tabela 7. Análise estatística dos excipientes formulados com a VRI utilizando a regressão de dados categóricos (SPSS® v. 17) sendo os resultados em verde das formulações que mostraram alto “score” de antigenicidade da VRI liofilizada e em vermelho o excipiente que mostrou o menor “score” de antigenicidade da VRI considerando a manutenção da potência da VRI durante a liofilização.

Formulação	Correlação	
	Zero-Order	Importância
Glutamato 0,5%	,481	,379
Glutamato 0,25%	,471	-,239
Glutamato 0,1%	,520	,615
Arginina 0,5%	,482	,733
Arginina 0,25%	-,093	-,070
Arginina 0,1%	-,710	-,537
Asparagina 0,5%	,492	,183
Asparagina 0,25%	-,202	,204
Asparagina 0,1%	-,318	-,069
Glicina 0,5%	-,942	-,915
Glicina 0,25%	-,725	-,547
Glicina 0,1%	-,938	-,894
Gelatina 0,5%	-,805	-,658
Gelatina 0,25%	-,573	-,471
Gelatina 0,1%	-,760	-,655
Dextran 40 0,5%	-,131	,161
Dextran 40 0,25%	-,362	-,460
Dextran 40 0,1%	-,292	-,698
PEG3350 0,5%	-,977	1,452
PEG3350 0,25%	-,531	-,690
PEG3350 0,1%	-,212	-,015
PEG6000 0,5%	,415	,241
PEG6000 0,25%	-,072	-,010
PEG6000 0,1%	-,247	,154
Manitol 2%	-,630	-,314
Manitol 1%	-,805	-,658
Manitol 0,5%	-,296	-,089

Correlação		
Formulação	Zero-Order	Importância
Sacarose 2%	,404	1,389
Sacarose 1%	-,194	-,039
Sacarose 0,5%	,404	,283
Lactose 2%	,637	,292
Lactose 1%	-,013	,015
Lactose 0,5%	,649	,424
Maltose 2%	,512	,321
Maltose 1%	,721	,692
Maltose 0,5%	,711	,483
Trealose 2%	-,761	,316
Trealose 1%	-,183	,686
Trealose 0,5%	,078	,004

Figura 21. Os excipientes que estiverem à esquerda apresentaram baixo “score” de antigenicidade. Os excipientes que estiverem no meio apresentaram médio “score” de antigenicidade e os excipientes que estiverem à direita (em verde) apresentaram alto “score” de antigenicidade em relação à VRI durante a liofilização.

Tabela 8. Visualização dos excipientes de acordo com a divisão de importância, sendo os que melhoraram a antigenicidade da potência da VRI aqueles que estão em verde.

BAIXO “SCORE” DE ANTIGENICIDADE	MÉDIO “SCORE” DE ANTIGENICIDADE	ALTO “SCORE” DE ANTIGENICIDADE
Glutamato 0,25%	Glutamato 0,5%	Arginina 0,5%
Arginina 0,1%	Glutamato 0,1%	PEG3350 0,5%
Glicina 0,5%	Arginina 0,25%	Sacarose 2%
Glicina 0,25%	Asparagina 0,5%	Maltose 1%
Glicina 0,1%	Asparagina 0,25%	Trealose 1%
Gelatina 0,5%	Asparagina 0,1%	
Gelatina 0,25%	Dextran 40 0,5%	
Gelatina 0,1%	PEG3350 0,1%	
Dextran 40 0,25%	PEG6000 0,5%	
Dextran 40 0,1%	PEG6000 0,25%	
PEG3350 0,25%	PEG6000 0,1%	
Manitol 1%	Manitol 0,5%	
Manitol 2%	Sacarose 1%	
	Sacarose 0,5%	
	Lactose 2%	
	Lactose 1%	
	Lactose 0,5%	
	Maltose 2%	
	Maltose 0,5%	
	Trealose 2%	
	Trealose 0,5%	

4.8. Simulação do processo de liofilização em liofilizador acoplado ao microscópio óptico

O liofilizador microscópico fornece imagens do congelamento, cristalização, colapso e fusão durante as 3 etapas da liofilização: o congelamento, a sublimação e a secagem secundária.

O liofilizador microscópico torna-se uma excelente ferramenta para confirmação dos resultados obtidos por DSC (Calorimetria exploratória diferencial). A vantagem do liofilizador microscópico é que ele fornece imagens em tempo real, as quais podem ser vistas pelos nossos próprios olhos durante o processo de liofilização.

Ao todo foram realizadas análises de 12 produtos, sendo eles: VRI (vacina rábica inativada), VRI + MEM (Minimum Essential Medium – Meio de cultivo celular), VRI + Arginina 0,5%, VRI + PEG 3350 0,5%, VRI + Sacarose 2%, VRI + Maltose 1%, VRI + Trealose 1%, VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Sacarose 2%, VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Maltose 1%, VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Trealose 1%, MEM e PBS (solução tampão fosfato). A diluição da vacina utilizada quando acrescida de excipientes foi de 1,5.

Figura 22. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI sem adição de excipientes (pura). Durante o resfriamento temos a foto da VRI líquida (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de $-23,9^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -47°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis (E), terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).

Figura 23. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + MEM. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de $-24,1^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (D) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-44,1^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).

Figura 24. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -24,1°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -41,5°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (E).

Figura 25. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + PEG 3350 0,5%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de $-23,3^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (D) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-29,4^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).

Figura 26. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Sacarose 2%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -22,7°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (B) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -51,9°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (C) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (D).

Figura 27. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Maltose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de $-20,6^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-54,8^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

Figura 28. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Trealose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de $-25,5^{\circ}\text{C}$. Próximo a $-49,7^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D e E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada (F).

Figura 29. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Sacarose 2%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de - 25,4°C. Próximo a -56,5°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

Figura 30. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Maltose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de - 24,3°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -53,3°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

Figura 31. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização da VRI + Arginina 0,5% + PEG 3350 0,5% + Trealose 1%. Durante o resfriamento temos a foto da formulação no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -24,7°C. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a -54,3°C aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (D) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

Figura 32. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização do MEM. Durante o resfriamento temos a foto do meio no estado líquido (A), e da matriz congelada (B) que ocorreu por volta de -24°C . Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (C e D) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-43,3^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (E) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

Figura 33. Imagens das diferentes fases da simulação do processo de liofilização do PBS. Durante o resfriamento temos a foto do tampão no estado líquido (A), e da matriz congelada (B e C) que ocorreu por volta de $-20,9^{\circ}\text{C}$. Já durante o aquecimento temos a formação da interface de liofilização (D e E) que separa a matriz seca (a escura mais externa) da matriz congelada. Próximo a $-44,9^{\circ}\text{C}$ aparecem indícios de micro colapsos na matriz seca (F) que pouco depois se tornam bastante visíveis, terminando por causar, inclusive, o derretimento da matriz congelada.

4.9. Curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC - Differential Scanning Calorimetry)

Basicamente a calorimetria exploratória diferencial mede o fluxo de calor em função da temperatura aplicada a uma amostra durante o seu congelamento e aquecimento, obtendo as temperaturas de cristalização, transição vítrea, eutético e fusão.

Com a realização do DSC ficou nítida a diferença da formulação da vacina com PBS, tampão utilizado constantemente na vacina em sua forma líquida, com a formulação da vacina utilizando meio de cultivo celular (MEM). Nas figuras 34, 35, 36 e 37 observamos a formação de um eutético sempre em temperaturas próximas a -21°C (com exceção da 35 onde ficou um pouco mais baixa), essa temperatura eutética provavelmente está ligada a presença de grande quantidade de NaCl no meio. Já a figura 36 a única em que a VRI foi diluída com tampão (PBS) ao invés de meio apresentou uma transição vítrea demonstrando que o produto se portou com características amorfas durante o seu congelamento.

Isso esclarece a dúvida que se iniciou com a análise de liofilização acoplada à microscopia óptica, onde as formulações da VRI com os excipientes dissolvidos em PBS apresentaram uma temperatura de colapso mais baixa do que a própria vacina rábica sem excipientes (que é composta em sua maioria por meio de cultivo celular).

Figura 34. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) sem adição de excipientes. O pico da cristalização ocorreu em $-13,83^{\circ}\text{C}$. Em seguida ocorreu um eutético em $-21,25^{\circ}\text{C}$ provavelmente relacionado à presença de NaCl no meio de cultivo MEM. Por fim a fusão da VRI ocorreu em $0,64^{\circ}\text{C}$.

Figura 35. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) com PEG 3350 0,5%. O pico da cristalização ocorreu em -18,13°C. Em seguida ocorreu um eutético em -29,67°C e por fim a fusão ocorreu em -0,23°C.

Figura 36. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) diluída em PBS (solução tampão de fosfato). O pico da cristalização ocorreu em -13,55°C. E depois uma transição vítrea a -56,04°C. Em seguida ocorreu um eutético em -20,95°C. Por fim a fusão da VRI ocorreu em 1,09°C.

Figura 37. Curva de DSC (Calorimetria exploratória diferencial) da VRI (vacina rábica inativada) diluída em MEM 2% SFB (Meio de cultivo celular Minimum Essential Medium com 2% de soro fetal bovino). O pico da cristalização ocorreu em -13,73°C. Depois um eutético em -21,22°C. Por fim a fusão da VRI ocorreu em 0,44°C.

4.10. Liofilização em frasco ampola

As diferentes formulações da VRI liofilizadas em frasco ampola no liofilizador FTS Systems, modelo TDS-00209-A, microprocessado encontram-se descritas na tabela 9.

Tabela 9. Diferentes formulações da VRI liofilizadas em frasco ampola.

FORMULAÇÃO	DILUIÇÃO
Vacina Rábica Inativada (VRI)	-
MEM 2% SFB (Minimum Essential Medium com 2% de soro fetal bovino)	-
VRI + MEM 2% SFB	1,5
VRI + Arginina 0,5%	1,5
VRI + PEG 3350 0,5%	1,5
VRI + Sacarose 2%	1,5
VRI + Maltose 1%	1,5
VRI + Trealose 1%	1,5
VRI + Arginina 0,5 % + PEG 3350 0,5% + Sacarose 2%	1,5
VRI + Arginina 0,5 % + PEG 3350 0,5% + Maltose 1%	1,5
VRI + Arginina 0,5 % + PEG 3350 0,5% + Trealose 1%	1,5

Para melhor visualização as figuras que ilustram a liofilização em frasco ampola encontram-se juntamente com as de microscopia eletrônica de varredura no item 4.12.

Figura 38. Fotografia do equipamento (FTS) mostrando ensaio da liofilização da vacina em frasco ampola no momento do fechamento das rolhas por meio da compressão das placas.

Figura 39. Processo de liofilização das formulações da vacina em frasco ampola.

4.11. Antibody-binding test (ABT) – Teste de ligação do anticorpo modificado

Após realização do teste de ligação do anticorpo modificado (ABT), as placas foram lidas em microscópio de fluorescência para contagem dos focos fluorescentes. Para cada poço foram lidos 10 campos, sendo considerados positivos quando apresentaram um ou mais focos fluorescentes e negativos quando não apresentaram.

Após a leitura completa da placa foi realizado o cálculo da potência da vacina em UI/mL (unidade internacional por mililitro) pelo método de Spearman-Kärber (tabela 10).

A vacina foi diluída 1,5 vezes para poder ser adicionado os excipientes sendo que esses foram diluídos em MEM 2% SFB (soro fetal bovino), já que o mesmo mostrou ser melhor diluente que o PBS (solução tampão de fosfatos) se tratando de liofilização por apresentar uma temperatura de colapso mais elevada em relação ao PBS.

Tabela 10. Resultado dos testes de potência (pelo método ABT) realizados com as formulações de VRI e excipientes que melhoraram a antigenicidade.

AMOSTRA	POTÊNCIA (UI/mL)	
	LÍQUIDA	LIOFILIZADA
Vacina Rábica Pura	1,8	1,7
Vacina Rábica + MEM	1,2	1,2
Vacina Rábica + Arginina 0,5%	1,3	1,1
Vacina Rábica + PEG3350 0,5%	1,1	1,1
Vacina Rábica + Sacarose 2%	1,1	1,3
Vacina Rábica + Maltose 1%	1,3	1,1
Vacina Rábica + Trealose 1%	1,2	1,2
Vacina Rábica + Arginina 0,5% + PEG3350 0,5% + Sacarose 2%	1,3	1,2
Vacina Rábica + Arginina 0,5% + PEG3350 0,5% + Maltose 1%	1,3	1,3
Vacina Rábica + Arginina 0,5% + PEG3350 0,5% + Trealose 1%	1,3	1,2

Figura 40. Gráfico demonstrando que o processo de liofilização não causou diferença significativa na potência da vacina independente do excipiente utilizado. Foi realizado teste t de student para amostras emparelhadas que resultou em $p=0,21258$ ($p>0,05$).

4.12. Microscopia eletrônica de varredura

Figura 41. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica pura liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 42. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica pura liofilizada em frasco ampola.

Figura 43. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + MEM 2% SFB (soro fetal bovino) liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 44. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + MEM 2% SFB (soro fetal bovino) liofilizada em frasco ampola.

Figura 45. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de meio de cultura MEM + 2% de Soro Fetal Bovino (MEM – Minimum Essential Medium) liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 46. Imagens das pastilhas formadas com o MEM (Minimum Essential Medium) + 2% SFB (soro fetal bovino) liofilizado em frasco ampola.

Figura 47. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 48. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + arginina 0,5% liofilizada em frasco ampola.

Figura 49. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 50. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.

Figura 51. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + maltose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 52. Imagens das pastilhas formadas com a vacina rábica + maltose 1% liofilizada em frasco ampola.

Figura 53. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + sacarose 2% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 54. Imagem do pó formado com a vacina rábica + sacarose 2% liofilizada em frasco ampola.

Figura 55. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + trealose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 56. Imagem do pó formado com a vacina rábica + trealose 1% liofilizada em frasco ampola.

Figura 57. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ maltose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 58. Imagem do pó formado com a vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ maltose 1% liofilizada em frasco ampola.

Figura 59. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ sacarose 2% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 60. Imagem do pó formado com a vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ sacarose 2% liofilizada em frasco ampola.

Figura 61. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ trealose 1% liofilizada. Aumento de 500, 7.500 e 15.000 vezes, da esquerda para a direita respectivamente.

Figura 62. Imagem do pó formado com a vacina rábica + arginina 0,5% + PEG 3350 0,5%+ trealose 1% liofilizada em frasco ampola.

4.13. Determinação da umidade residual

O resultado da umidade residual da vacina rábica com PEG 3350 foi de 1,60% (tabela 11), considerado satisfatório e dentro do esperado para uma vacina (inferior a 3%). Dentre todas as formulações da VRI realizadas em frasco ampola, a VRI com PEG 3350 0,5% foi a que apresentou o melhor aspecto da pastilha liofilizada (figura 50), sem alteração de tamanho (encolhimento ou colapso) e uma estrutura regular e homogênea.

Tabela 11. Resultado da umidade residual da vacina rábica com PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola (n=4).

AMOSTRA	UMIDADE RESIDUAL (%)
VRI + PEG3350 0,5%	1,60 ± 0,42

Resultado = Média ± Desvio Padrão

4.14. Isotermas de adsorção de umidade

Muitas das operações unitárias usadas no processamento de fármacos e produtos biológicos têm como objetivo, de uma maneira ou outra, a remoção da água ou inibição de seus efeitos para se obter a estabilização do material.

O principal e essencial meio para a medição da imobilidade da água é através da função que existe entre teor de umidade (W) e atividade de água (A_w). A atividade de água é definida como sendo o quociente entre a pressão de vapor da água presente no produto (P) e a pressão de vapor da água pura (P_o), na mesma temperatura. A seguinte equação define esta relação, apresentando também o conceito de umidade relativa de equilíbrio (W_e):

$$A_w = \frac{P}{P_o} = \% \frac{W_e}{100}$$

Baseado no conceito termodinâmico de potencial químico da água, A_w é utilizada como um índice de quão satisfatoriamente está sendo feito o controle do comportamento da água em um produto (Labuza, 1984), bem como é o parâmetro que controla a força motora em operações de remoção de água sendo, portanto, essencial ao planejamento de processos (Ginsburg, 1981). A atividade de água

caracteriza o estado da água em um material, ou seja, é uma medida da disponibilidade da água para promover alterações físicas, químicas ou biológicas.

O estudo do comportamento higroscópico de produtos liofilizados pode ser feito com o auxílio de isotermas de sorção de umidade. As isotermas de sorção podem ser definidas como curvas que relacionam a pressão parcial do vapor de água nos alimentos com seu conteúdo de umidade a uma determinada temperatura. As isotermas permitem estimar a força de ligação das moléculas de água em relação ao sólido no qual se encontram sorvidas.

O final de uma secagem é em geral determinado pela atividade de água desejável ao produto acabado (Iglesias & Chirife, 1976 a, b; Kapsalis, 1981, 1986). Isotermas de sorção de umidade combinadas com equações de transporte de massa, ou seja, equações do tipo força motora / resistência são utilizadas para predição do tempo de armazenamento baseados numa atividade de água crítica, em relação a algum atributo do alimento em um sistema definido de embalagem sob condições ambientes estabelecidas (Pitombo, 1998). O calor de sorção pode ser usado para estimar a energia necessária para a secagem do produto.

A equação BET foi primeiramente postulada por Brunauer, Emmett e Teller (1938). Esta equação pode se derivada de mecanismos cinéticos e estatísticos, como também de considerações termodinâmicas. A equação BET é:

$$W = \frac{W_m * C * A_w}{(1 - A_w) * [1 + (C - 1)A_w]}$$

sendo,

W , teor de umidade (g/ 100g m.s.)

Wm, teor de umidade na monocamada (g/ 100g m.s.)

C, constante relacionada ao calor de sorção

Aw, atividade de água do produto.

As isotermas BET mais utilizadas contêm atividades de água na faixa de 0,05 a 0,45, mas estas fornecem dados suficientes para que os parâmetros Wm e C possam ser calculados (Labuza, 1968). O conceito de monocamada é útil devido a sua relação com os vários aspectos físicos e químicos da deterioração em alimentos desidratados (Iglesias & Chirife, 1976). Além disto, o valor da monocamada do BET é um método bastante efetivo para se estimar a quantidade de água ligada a pontos

polares específicos nos produtos desidratados (McLaren & Rowen, 1952; Duckworth & Smith, 1963).

Isotermas de adsorção de umidade da vacina liofilizada com PEG 3350 0,5%, construídas em três temperaturas, apresentam-se na figura 63.

As isotermas mostram a variação na atividade de água com a mudança do conteúdo de umidade da amostra, a uma determinada temperatura. O trecho inicial da isoterma corresponde à monocamada, onde a água está fortemente ligada ao produto. O trecho intermediário corresponde à multicamada, onde a água está levemente ligada ao produto. O trecho final da isoterma corresponde à região de água livre (Pitombo, 1998).

Observando-se as isotermas, verificou-se um aumento no valor de W em função da temperatura. Pode-se verificar também que para atividades de água menores que 0,70 o conteúdo de água absorvida pelo produto é pequeno comparado ao ganho observado após esse valor.

Figura 63. Efeito da temperatura sobre as isotermas de sorção de umidade da vacina rábica com PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.

A representação gráfica da equação de BET, para as diferentes temperaturas é mostrada na figura 64. A linearidade verificada pelo coeficiente de correlação da reta confirma a validade do modelo, para a faixa de atividade de água selecionada.

Figura 64. Representação gráfica da equação de BET vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.

Os valores da constante C, valor monomolecular (W_m) e área superficial obtidos estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros da equação de BET para vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola.

Temperatura (°C)	C	W_m (g/ 100g m.s.)	Área superficial (m ² /g)
15	1,6808	2,5947	108,688
25	9,7294	12,0919	505,355
35	107,1111	10,3734	433,087

Pode-se observar que os valores de umidade de monocamada à 25°C e 35°C apresentam-se próximos e em torno de 10-12%, indicando uma alta estabilidade do produto nessas temperaturas.

5. CONCLUSÃO

- O ELISA padronizado e utilizado como teste para verificação da antigenicidade de diferentes formulações da vacina rábica liofilizada em microplacas apresentou-se uma técnica eficiente e rápida na triagem dos melhores excipientes testados, e ainda teste de escolha para amostras não estéreis.
- A liofilização em microplacas das formulações da vacina rábica e dos diferentes excipientes, em comparação ao uso de frasco ampola, se mostrou uma alternativa mais econômica e rápida, além de manter uma maior uniformidade na transmissão de temperatura entre as amostras devido à proximidade entre os poços da microplaca.
- A análise estatística dos dados obtidos com o ELISA para a escolha das melhores formulações foi a regressão de dados categóricos (catreg) resultando que a Arginina 0,5%, o PEG 3350 0,5%, a Sacarose 2%, a Maltose 1% e a Trealose 1% foram as formulações que deram melhores resultados, em comparação à vacina liofilizada sem adição de excipientes durante o processo de liofilização em microplacas.
- Analisando-se estatisticamente (teste t de student para amostras emparelhadas) os resultados de potência obtidos pelo teste de ligação do anticorpo modificado (ABT), concluiu-se que o processo de liofilização em frasco ampola não causou diferença significativa ($p > 0,05$) na potência da vacina rábica independente do excipiente utilizado.
- A pastilha da vacina rábica + PEG 3350 0,5% liofilizada em frasco ampola apresentou a elegância farmacêutica esperada de um produto liofilizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D.. New Lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*). *Emer. Infect. Dis.* 9, p. 333-337, 2003.

ARKO, R. J.; WIKTOR, T. J.; SIKES, R. K.. The antibody binding test for vaccine potency. In: KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H.. *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. World Health Organization, Geneva. 1973. p. 292-94.

BAER, G. M.. *The natural history of rabies*, 2nd ed. United States: CRC Press, 1991.

BAER, G. M.. Evaluation of an animal rabies vaccine by use of two types of potency tests. *Am. J. Vet. Res.* 58(8), p. 837-40, 1997.

BANERJEE, A. K.. Transcription and replication of Rhabdoviridae. *Microbiol. Rev.* 51, p. 66-67, 1987.

BARTH, R.. The modified antibody-binding test for in vitro quantification of rabies virus antigen in inactivated rabies vaccine. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H.. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. World Health Organization, Geneva. 1996. p. 394-97.

BARTH, R., DIDERRICH, G., WEINMANN, E.. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. *Vaccine*. 4, p. 369-377, 1988

BINAGRI (Biblioteca Nacional de Agricultura): Controle da raiva dos herbívoros. Manual técnico Brasília: MAPA/DAS/DAS, 2005. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/PROGRAMAS/AREA_ANIMAL/CRHE/PNCRH/MT_PARA_CONTROLE_DA_RAIVAHARBIVOROS_0.PDF (Acesso em 20 de agosto de 2008).

BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M.. Moisture sorption isotherm characteristics of freeze-dried D-limonene emulsions in modified chitosan and maltodextrin. *Drying Technology*, v. 26, p. 1-7, 2008.

BOTVINKIN, A. D.; POLESCHUK, E. M.; KUZMIN, I. V.; BORISOVA, T. I.; GAZARYAN, S. V.; YA, P.. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emer. Infect. Dis.* 9, p. 1623-1625, 2003.

BOURHY, H.; SUREAU, P.; TORDO, N.. From rabies to rabies related viruses. *Vet. Microbiol.* 23, p. 115-128, 1990.

BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E.. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, v.60, p.309, 1938.

CAPORALE, G. M. M.. Purificação de vírus da raiva e ribonucleoproteínas para produção de conjugados fluorescentes. 89 p. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. USP, Instituto Butantan e IPT, São Paulo, 2006.

CARINI, A.. Sur une grande epizootie de rage. *Ann. Inst. Pasteur.* v. 25, p. 843-846, 1911.

CDER New and Generic Drug Approvals: 1998-2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/approval/index.htm> (Acesso em 18 de fevereiro de 2009).

CHANG, B. S.; PATRO, S. Y.. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals. In: CONSTANTINO, H. R.; PIKAL, M. J.. *Lyophilization of biopharmaceuticals*. v. 2. USA: AAPS, 2004. p. 113-138.

CHAPMAN, W. G.; RANSHAW, I. A.; CRICK, J.. Inactivated rabies vaccine produced from the Flury LEP strain of virus grown in BHK-21 suspension cells. *Appl. Microbiol.*, 26, p. 858-862, 1973.

COHEN, M. W.; THORBECKE, G. J.. Specificity of reaction to antigenic stimulation in lymph nodes of immature rabbits: II. Suppression of local morphologic reactions to alum precipitated bovine serum albumin by intraperitoneal injections of soluble bovine serum albumin in neonatal rabbits. *J. Immunol.* v. 93, p. 629-636, 1964.

CONSTANTINO, H. R.. Excipients for use in lyophilized pharmaceutical peptide, protein, and other bioproducts. In: CONSTANTINO, H. R.; PIKAL, M. J.. Lyophilization of biopharmaceuticals. v. 2. USA: AAPS, 2004. p. 139-228.

CONSTANTINO, H. R.; PIKAL, M. J.. Lyophilization of biopharmaceuticals. v. 2. USA: AAPS, 2004. p. xi-xiii.

COX, J. H. I.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L. G.. Rabies virus glycoprotein II. Biological and serological characterization. *Infect. Immune.* 16, p. 754-759, 1977.

de MOURA, W. C., de ARAUJO, H. P., CABELLO, P. H., ROMIJN, P. C., LEITE, J. P.. Potency evaluation of rabies vaccine for human use: the impact of the reduction in the number of animals per dilution. *J. Virol. Methods.* v. 158(1-2), p. 84-92, 2009.

DUCKWORTH, R. B.; SMITH, G. M. The environment for chemical change in dried and frozen foods. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.22, p.182, 1963.

FRESHNEY, R. I.. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique.* 5th ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

GALLEGOS GALLEGOS, R. M., ESPINOSA LARIOS, E. L., RAMOS RAMÍREZ, L., KRETSCHMER SCHMID, R., AGUILAR SETIÉN, A.. Rabies veterinary virus vaccine produced in BHK-21 cells grown on microcarriers in a bioreactor. *Arch Med Res.* 26(1), p.59-63, 1995.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W. H.; TUFFEREAU, C.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A.. Rabies virus glycoprotein is a trimmer. *Virology.* 84, p. 441-444, 1992.

GRANT, Y.; MATEJTSCHUK, P.; DALBY, P. A.. Rapid optimization of protein freeze-drying formulations using ultra scale-down and factorial design of experiment in microplates. *Biotechnology and Bioengineering.* v. 104 (5), p. 957-964, 2009.

GINSBURG, A. S. The forms and energy of moisture binding in foods as a basis for choosing rational methods for processing and storage. In: ROCKLAND, L. B.; STEWART, G. F.. *Water activity: influences on food quality.* New York: Academic Press, 1981, p. 679.

HENDRIKSEN, C. F.. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Review of Vaccines*. v. 8 (3), p. 313-322, 2009.

IGLESIAS, H. A.; CHIRIFE, J. Isosteric heats of water sorption on dehydrated foods. Part II. Hysteresis and heat of sorption comparison with BET theory. *Food Science and Technology*, v.9, p.107, 1976a.

IGLESIAS, H. A.; CHIRIFE, J. B.E.T. Monolayer values in dehydrated foods and food components. *Food Science Technology*, v.9, p. 1113, 1976b.

ITO, Y.; NISHIZONO, A; MANNEN, K.; HIRAMATSU, K.; MIFUNE, K.. Rabies virus M protein expressed in *Escherichia coli* and its regulatory role in virion-associated transcriptase activity. *Arch. Virol.* 141, p. 671-683, 1996.

JAGANNATHAN, S.; CHAANSHA, S.; RAJESH, K.; SANTHIYA, T.; CHARLES, C.; VENKATARAMANA, K. N.. Standardization and assessment of cell culture media quantities in roller poly ethylene terephthalate bottles employed in the industrial rabies viral vaccine production. *Pak. J. Biol. Sci.* 15; 12(18), p. 1246-1252, 2009.

KALLEL, H.; ROUROU, S.; MAJOUL, S.; LOUKIL, H.. A novel process for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-l bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(5-6), p. 441-446, 2003.

KAPLAN, G.; TURNER, G. S.; WARREL, D.. *Rabies: the facts*. 2nd ed. Kaplan G ed. Oxford Medical Publications, 1986. p. 8-74.

KAPSALIS, J. G. Moisture sorption hysteresis. In: ROCKLAND, L. B.; STEWARD, G. F.. *Water activity: influence on food quality*. New York: Academic Press, 1981, p. 143-177.

KAPSALIS, J. G. Influences of hysteresis and temperature on moisture sorption isotherms. In: ROCKLAND, L. B.; STEWARD, G. F.. *Water activity: theory and applications to food*. New York: Marcel Dekker, 1986, p. 173-214.

KORNFELD, R.; KORNFELD, S.. Assembly of asparaginase-linked oligosaccharides. *Annu. Ver. Biochem.* 54, p. 631-664, 1985.

KOTAIT, I; GONÇALVES, C. A.; SOUZA, M. C. A. M.; TARGUETA, M. C.. Controle da raiva dos herbívoros. Manual técnico nº. 1 do Instituto Pasteur. Instituto Pasteur, São Paulo, S. P., 1998.

KRÄMER, B.; BRUCKNER, L.; DAAS, A.; MILNE, C.. Collaborative study for validation of a serological potency assay for rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. Pharmeur. Bio. Sci. Notes. 2, p. 37-55, 2010

KUZMIN, I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; KAMEOKA, Y.. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. Virus Res. 97, p. 65-79, 2003

LABUZA, T. P. Sorption phenomena in foods. Food Technology, Chicago, v. 22, p. 15-24, 1968.

LABUZA, T. P. Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurement and use. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, 1984, 150p.

LAFON, M.; WIKTOR, T. J.. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non structural protein. J. Gen. Virol. 66, p. 2125-2133, 1985.

LARGHI, O. P.; SAVY, V. L.; NEBEL, A. E.; RODRIGUEZ, A. Ethylenimine inactivated rabies vaccine of tissue culture origin. J. Clin. Microbiol., 3, p. 26-33, 1976.

LEIRNER, A. A; TATTINI JR., V.; PITOMBO, R. N. M.. Prospects in Lyophilization of Bovine Pericardium. Artificial Organs, v. 33, p. 221-229, 2009.

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TGNOR, G. H.. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? Science. 215, p. 182-184, 1982.

LENTZ, T. L.; WILSON, P. T.; HAWROT, E.; SPEICHER, D. W.. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. Science. 226, p. 847-848, 1984.

MATSUMOTO, S.. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. Virology. 17, p. 198-202, 1962.

CHANG, L. L.; SHEPHERD, D.; SUN, J.; OUELLETTE, D.; GRANT, K. L.; TANG, X. C.; PIKAL, M. J.. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *J Pharm Sci* 94:1427–1444, 2005.

MCLAREN, A. D.; ROWEN, J. W. Sorption of water vapor by proteins and polymers: a review. *Journal of Polymer Science*, v. 7, p. 289, 1952.

MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H.. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. World Health Organization, Geneva. 1996.

MOURA, W. C.; GALLINA, N. M. F.; FUCHES, R. M. M.; ROMIJN, P. C.; LEITE, J. P. G.. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. *J. Virol. Methods*. v. 154 (1-2), p. 7-13, 2008.

MURGATROYD, K.. The freeze-drying process. In: CAMERON, P.. Good pharmaceutical freeze-drying practice. Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, 1997. p. 1-23.

MURPHY, F. A.. Morphology and morphogenesis. In: BAER, G. M.. The natural history of rabies. 2nd ed. United States: CRC Press, 1991. p. 33-61.

PERRIN, P.; MADHUSUDANA, S.; GONTIER-JALLET, C.; PETRES, S.; TORDO, N.; MERTEN, O. W.. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. *Vaccine*. 13, p. 1244-1250, 1995.

PITOMBO, R. N. M. Relações entre água e propriedades mecânicas da carne bovina liofilizada. São Paulo, 1998, 158p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

PITOMBO, R. N. M.. Lyophilized bovine pericardium treated with phenethylamine-diepoide as an alternative for cardiovascular bioprosthesis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LYOPHILIZATION AND FREEZE DRYING, 4th, 2008, Dublin. INTERNATIONAL CONFERENCE ON LYOPHILIZATION AND FREEZE DRYING, 4th, 2007.

PITOMBO, R. N. M.. Liofilização. In: KIKILIAN, B. V.; PESSOA JUNIOR, A.. (Org.). Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: Manole, 2005, p. 337-357.

PITOMBO, R. N. M.; LIMA, G. A. M. R.. Nuclear magnetic resonance and water activity in measuring the water mobility in pintado fish. *Journal of Food Engineering*. v. 58, p. 59-66, 2003.

PITOMBO, R. N. M.; SPRING, C.; PASSOS, R. F.; TONATO, M.; VITOLO, M.. Effect of moisture content on invertase activity of freeze-dried (*S.Cerevisae*). *Cryobiology*. v. 31, p. 383-392, 1994.

PITOMBO, R. N. M.. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. *Ciência e Cultura (SBPC)*, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 427-431, 1989.

PRECAUSTA, P.; GENIN, N.; BÉNET, G.; TOURNEUR, N.. Industrial freeze-drying of vaccines destined for veterinary purposes: an overview. In: REY, L.; MAY, J. C.. *Freeze-drying/ Lyophilization of pharmaceutical and biological products*. New York-Basel: Marcel Dekker, Inc.1999. p. 337-357.

REAGENTE CORANTE CONCENTRADO BioAgency: Ensaio de Proteína Bradford (cod. 500-0006N). Disponível em: <http://www.bioagency.com.br/novo/protocolos/500-0006N.pdf> (Acesso em 24 de maio de 2010).

ROTIVEL, Y.; GOLDAL, M.; PERRIN, P.; TORDO, N.. Une histoire de la vaccination contre la rage. *Virologie*. 6, p. 89-104, 2002.

RUPPRECHT, C. E.; GIBBONS, R. V.. Prophylaxis against rabies. *N. Engl. J. Med*. 351, p. 2626-2635, 2004.

SANTOS, M. C.; LIMA, M. R. D.; FURTADO, G. C.; COLLETO, G. M. D. D.; KIPNIS, T. L.; SILVA, W. D.. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: a fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. *Toxicon*. v. 27 (3), p. 297-303, 1989.

SCHNEIDER, L. G.; DIETZSCHOLD, B.; DIERKS, R. E.; MATTHAEUS, W.; ENZMANN, P. J.; STROHMAIER, K.. Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses. *J. Virol.* 11, p. 748-755, 1973.

SCHNEIDER, L. G.. Antigenic variants of rabies virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 5, p. 101-107, 1982.

SEARLES, J. A.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W.. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine $T(g)'$ in pharmaceutical lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 90(7), p. 872-87, 2001.

SELIGMANN JR, E. B.. The NIH test for potency. In: KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H.. *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. World Health Organization, Geneva. 1973. p. 279-86.

SHAKIN-ESHELMAN, S. H.; REMALEY, A. T.; ESHELMAN, J. R.; WUNNER, W. H.; SPITALNIK, S. L.. N-linked glycosilation of rabies virus glycoprotein: individual sequins differ in their efficiencies and influence on cell surface expression. *J. Biol. Chem.* v. 267, p. 10690-10698, 1992.

SMITH, J. S.; Yager, P. A.; Baer, G. M.. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H.. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. World Health Organization, Geneva. 1996. p. 181-192.

SOARES, L. A.; GUIMARAES, G. M.; POLAKIEWCS, B.; PITOMBO, R. N. M.; ABRAHAO NETO, J.. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* l-asparaginase. *Int. J. of Pharm.* v. 237, n. 1-2, p. 163-170, 2002.

SURPETI, F.; DERED, M.; TSIANG, H.. Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *J. Gen. Virol.* v. 65, p. 781-789, 1984.

TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M.. Effect of lyophilization on structure and phase changes of pegylated-bovine serum albumine. *Int. J. of Pharm.* v. 304, p. 124-134, 2005.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acid Res.* v. 14, p. 2671-2683, 1986.

TORDO, N.. Contribution of molecular biology to vaccine development and molecular epidemiology of rabies disease. *Mem. Inst. Butantan.* v. 53, p. 31-51, 1991.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMOM, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MACGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B.. *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*, Academic Press, San Diego, California, 2000.

VANSTEENBERGHE, M. P.. Procédé de conservation du virus rabique a l'état sec. *C. r. Séanc. Soc. Biol.* v. 55, p. 1646-47, 1903.

WANG, D. Q.. Formulation characterization. In: REY, L.; MAY, J. C.. *Freeze-drying/ Lyophilization of pharmaceutical and biological products*. New York- Basel: Marcel Dekker, Inc. 2004. Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/doi/pdf/10.1201/9780203021323.ch7> (Acesso em 02 de fevereiro de 2010).

WHITT, M. A.; BUONOCORE, L.; PREHAUD, C.; ROSE, J. K.. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology.* v. 185, p. 681-688, 1991.

WIKTOR, T. J.. Tissue culture methods. In: KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H.. *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. World Health Organization, Geneva. 1973. p. 101-123.

WIKTOR, T. J.; FLAMAND, A.; KOPROWSKY, H.. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. *J. Virol. Meth.* 1, p. 33-46, 1980.

WILBUR, L. A.; AUBERT, M. F. A.. The NIH test for potency. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H.. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. World Health Organization, Geneva. 1996. p. 360-68.

WUNDERLI, P. S.; DREESEN, D. W.; MILLER, T. J.; BAER, G. M.. The rabies peripheral challenge test: more accurate determination of vaccine potency. Vaccine. 24(49-50), p. 7115-7123, 2006.

WUNNER, H. W.. Rabies virus. In: JACKSON, C. A.; WUNNER, H. W.. Rabies. San Diego: Academic Press, 2002. p. 23-77.

WHO Technical Report no. 840. Requirements for Rabies Vaccine for Veterinary Use (requirements for biological substances no. 29, Amendment 1992). Geneva:World Health Organization; 1994.