



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

WILSON MURILO CORREA DA SILVA FERRARI

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE TACROLIMO
PROVENIENTE DE *Streptomyces tsukubaensis*

CAMPINAS
2018

WILSON MURILO CORREA DA SILVA FERRARI

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE TACROLIMO
PROVENIENTE DE *Streptomyces tsukubaensis*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Professor Doutor Marco Aurélio Cremasco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO WILSON MURILO CORREA DA SILVA FERRARI E ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR MARCO AURÉLIO CREMASCO.

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003017034P8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

F412r Ferrari, Wilson Murilo Correa da Silva, 1987-
Recuperação e purificação de tacrolimo proveniente de streptomyces
tsukubaensis / Wilson Murilo Correa da Silva Ferrari. – Campinas, SP : [s.n.],
2018.

Orientador: Marco Aurélio Cremasco.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Tacrolimo. 2. Purificação. 3. Cromatografia líquida. 4. Adsorção. 5.
Streptomyces. 6. Imunossupressor. I. Cremasco, Marco Aurélio, 1962-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Recovery and purification of tacrolimus from streptomyces
tsukubaensis

Palavras-chave em inglês:

Tacrolimus

Purification

Liquid chromatography

Adsorption

Streptomyces

Immunosuppressant

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Marco Aurélio Cremasco [Orientador]

Nehmias Curvelo Pereira

Márcio Caliar

Sônia Maria Alves Bueno

Igor Tadeu Lazzaroto Bresolin

Data de defesa: 12-06-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação da Defesa de Tese defendida por Wilson Murilo Correa da Silva Ferrari e aprovada em 12 de junho de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira

Instituição: Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dr. Marcio Caliarí

Instituição: Universidade Federal de Goiás (UFG)

Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Vanderlei e Tânia, por me fornecerem os verdadeiros ensinamentos para vida. E às minhas queridas irmãs, Ana Caroline e Vitória, por fazerem parte de minha história, e, por me incomodarem de vez em quando.

À minha amada esposa Karoline Deliberali Ferrari por acreditar em meus sonhos, me motivar e nunca me deixar desistir.

Ao professor doutor Marco Aurélio Cremasco pela oportunidade concedida para a realização do mestrado, do doutorado e por sua orientação. Espero poder chamá-lo sempre de amigo.

À professora doutora Telma Teixeira Franco por ter nos acolhidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renovável. E a toda a sua equipe, em especial à Andrea Tamayo Peña, por toda a ajuda, tempo e paciência.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Em especial, agrago à Fabiane Suassuna, ao Fabrício dos Santos, ao Levi Esmael Madeira, e à Rosângela Pedroz.

Aos meus caros amigos de laboratório Ana Carolina do Nascimento, Alex Martins, Jean Moreira e Sephorah Silva pela valiosa ajuda que deram e pela agradável convivência.

Aos amigos, novos e de longa data, Alan, Anna Guimarães, Bruna, Bruno, Evandro, Felipe, Fernando, Giovana, Helder, Karina, Lucas, Mayara, Raphael, Rhelvis, Rodrigo, Sid e Victor.

Aos meus amados parentes e amigos de Cascavel que sempre estão em meus pensamentos.

Às equipes dos podcasts Fronteiras da Ciência, Papricast, e do grupo Portal Deviante pelas várias horas de trabalho, divertimento e caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, mas não foram mencionados o meu muito obrigado.

“A paixão é o que nos ajuda nos tempos mais difíceis que poderiam tornar fracos homens fortes ou fazer você desistir.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

O tacrolimo, conhecido por FK-506, é uma lactona macrolídea amplamente utilizada nos protocolos terapêuticos imunossupressores, principalmente em transplantes de rins, fígado, coração, pulmão e de medula óssea. O fármaco é um imunossupressor da classe dos inibidores de calcineurina utilizado em terapias de imunossupressão como agente de primeira linha. No Brasil, onde se encontra o maior sistema público de transplantes de órgãos e tecidos do mundo, o tacrolimo integra a lista de medicamentos de alto custo do Sistema Único de Saúde (SUS) e é um dos principais responsáveis pelo alto valor da terapia. Este trabalho tem como objetivo desenvolver um processo robusto e inédito para a purificação do tacrolimo proveniente de qualquer meio fermentativo que o produza. O processamento consiste, em linhas gerais, na pré-purificação do caldo fermentado, com a sequência de purificação com técnicas cromatográficas e cristalização do produto final. Para avaliar o processo, três diferentes caldos fermentados produzidos pela *Streptomyces tsukubaensis* foram preparados variando a fonte de carbono e nitrogênio para testar o processo de pré-purificação e purificação. Na pré-purificação, o caldo fermentado contendo o fármaco foi extraído com diferentes solventes, concentrado por evaporação e tratado com a resina DIAION[®] HP-20. Após o pré-tratamento constatou-se a redução de mais de 97% dos açúcares redutores e proteínas totais, e 99% do volume do caldo foi reduzido. Enquanto a redução da massa do tacrolimo foi de apenas 23%. Na etapa de purificação utilizou-se 2 sistemas cromatográficos, ambos com a fase móvel composta por acetonitrila e água. A primeira coluna empregou grupo amino (NH₂) ligado à sílica e a segunda octadecilsilano (C18) para isolar o tacrolimo. As colunas cromatográficas foram operadas em série para purificar 82 mg de tacrolimo proveniente de 3L de caldo fermentado com 194 mg do fármaco. Por fim, a amostra purificada pelo sistema cromatográfico foi extraída com acetato de etila e o tacrolimo cristalizado por evaporação lenta. O produto final apresentou 80 mg e pureza de 98%. A impureza do cristal é constituída pelos epímeros diol (tautômeros I) e C-10 (tautômero II) do próprio tacrolimo.

Palavras-Chave: Tacrolimo diol, Tacrolimo C-10, Purificação, Cromatografia Líquida, Adsorção, Macrolídeo, DIAION[®] HP-20, C18, Octadecilsilano, Fase Amino, Luna[®] NH₂, HILIC, Imunossupressor, FK-506, *Streptomyces* sp.

ABSTRACT

Tacrolimus, known as FK-506, is a macrolide lactone widely used in immunosuppressive therapy, mainly in kidney, liver, heart, lung and bone marrow transplants. The drug is an immunosuppressant of the class of calcineurin inhibitors used in immunosuppressive therapies as a first-line agent. Brazil has the biggest public system of organ and tissue transplants in the world. The Unified Health System of Brazil provides free tacrolimus for population, but the drug is one of the main responsible for the high cost of the therapy to the country. This work aims to a robust and unprecedented process for the purification of tacrolimus from any fermentation medium it produces. The processing consists generally of pre-purification of the fermented broth, the purification sequence with chromatographic techniques and crystallization of the final product. The total process isolated the tacrolimus from three fermented broth obtained from different carbon/nitrogen source using *Streptomyces tsukubaensis*. In the step of pré-purification, extraction by different solvents, concentration by evaporation and adsorption by the DIAION® HP-20 resin purified the fermented broth in pre-treatment. After pre-treatment, pre-purification reduced 97% of reducing sugars, 97% of total protein, and 99% of the broth volume. Only 23% of tacrolimus mass was lost. Two chromatographic systems carried out the purification step. Acetonitrile and water composed the mobile phase to both chromatographic systems. The first column employed silica-bound (NH₂) group and the second octadecylsilane (C18) to isolate tacrolimus. The two chromatographic systems operated in series to purify 82 mg of tacrolimus from 3L of fermented broth with 194 mg of tacrolimus. Finally, ethyl acetate extracted the tacrolimus from the purified sample and slow evaporation crystallized the drug. The final product presented 80 mg and purity of 98%. The impurity of the crystal consists of the diol (tautomer I) and C-10 (tautomer II) epimers of tacrolimus itself.

Keywords: Diol tacrolimus, C-10 tacrolimus, Purification, Liquid Chromatography, Adsorption, Macrolide, DIAION® HP-20, C18, Octadecylsilane, Amino Phase, Luna® NH₂, HILIC, Immunosuppressant, FK-506, *Streptomyces* sp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Fórmula molecular tridimensional do tacrolimo.
- Figura 2.1 (a) Gastos públicos com saúde no Brasil; e (b) Relação de gastos com suporte profilático e terapêutico e despesas com medicamentos.
- Figura 2.2 Evolução anual dos doadores efetivos no Brasil.
- Figura 2.3 Transplantes realizados no Hospital de Clínicas da Unicamp.
- Figura 2.4 (a) Potenciais doadores de órgãos no país; e (b) Necessidade Estimada e número de transplantes realizados no Brasil em 2016.
- Figura 2.5 Estrutura molecular do tacrolimo.
- Figura 2.6 Reação de epimerização do tacrolimo em tacrolimo diol.
- Figura 2.7 Reação de tautomerização do tacrolimo diol para tacrolimo C-10.
- Figura 2.8 Estruturas moleculares da ascomicina, meridamicina, FK-506D e FK-525.
- Figura 3.1 Aparato utilizado na fermentação.
- Figura 3.2 Trocador de calor para o sistema cromatográfico.
- Figura 3.3 Representação dos componentes do trocador de calor.
- Figura 3.4 Curva de calibração do tacrolimo.
- Figura 3.5 Curvas de calibração para determinação de proteínas totais.
- Figura 3.6 Curvas de calibração para determinação de açúcares redutores.
- Figura 4.1 Produção de tacrolimo em fermentação em *shaker*.
- Figura 4.2 Mistura bifásica obtida ao se diluir o composto oleoso da fermentação com maltose com solução aquosa de acetonitrila.
- Figura 4.3 Mistura trifásica obtida ao se diluir o composto oleoso da fermentação com óleo de castanha-do-brasil com solução aquosa de acetonitrila.
- Figura 4.4 Cromatogramas do produto extraído da DIAION[®] HP-20.
- Figura 4.5 Comparação da coloração na amostra de DIAION[®] HP-20 antes e após a etapa de purificação.
- Figura 4.6 Amostras da pré-purificação do caldo fermentado com glicose: Caldo

concentrado (esquerda), fase leve (meio) e amostra pré-purificada (direita).

- Figura 4.7 Resolução, seletividade, pressão e tempo de retenção do tacrolimo em relação à impureza da amostra pré-purificada.
- Figura 4.8 Perfil de eluição do tacrolimo e fase leve.
- Figura 4.9 Padrão de tacrolimo em coluna semipreparativa.
- Figura 4.10 Amostra pré-purificada em coluna semipreparativa com diferentes em diferentes temperaturas.
- Figura 4.11 Amostra pré-purificada em coluna semipreparativa com diferentes fases móveis.
- Figura 4.12 Padrão de tacrolimo e APP em coluna semipreparativa NH₂.
- Figura 4.13 Injeção na coluna semipreparativa C18 para purificação de tacrolimo.
- Figura 4.14 Cromatograma da primeira cristalização utilizando padrão de tacrolimo.
- Figura 4.15 Cromatograma do cristal obtido pelo processo de cristalização do Passo (c) da purificação.
- Figura 4.16 Cromatograma do tacrolimo cristalizado com alta pureza.
- Figura 4.17 Comparação visual do tacrolimo padrão e o tacrolimo purificado.
- Figura 4.18 DSC do cristal de tacrolimo obtido pelo processo de purificação.
- Figura A.1 Porosidade total da coluna semipreparativa C18.
- Figura B.1 Porosidade total e fração de vazios da coluna semipreparativa NH₂.
- Figura C.1 Padrão do tacrolimo e amostra da fermentação de *S. tsukubaensis* para a produção de tacrolimo.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1 Antibióticos produzidos por *Streptomyces* sp.
- Tabela 2.2 Colunas de diferentes escalas de separação.
- Tabela 2.3 Diferenças entre cromatografia analítica e preparativa.
- Tabela 2.4 Tipos de adsorventes cromatográficos e os mais importantes princípios de interação.
- Tabela 2.5 Fase móvel usada para quantificar o tacrolimo em C18.
- Tabela 2.6 Compostos inertes para a determinação experimental das porosidades.
- Tabela 3.1 Materiais utilizados para placa de Petri, pré-inoculação e inoculação.
- Tabela 3.2 Relação de compostos utilizados para a fermentação.
- Tabela 3.3 Adsorventes usados na etapa de purificação.
- Tabela 3.4 Meios filtrantes usados na purificação.
- Tabela 3.5 Inertes utilizados na determinação da porosidade.
- Tabela 3.6 Solventes empregados na extração, fase móvel.
- Tabela 3.7 Reagentes usados na quantificação de proteínas totais.
- Tabela 3.8 Reagentes usados na quantificação açúcares redutores.
- Tabela 3.9 Meio de pré-inoculação e inoculação.
- Tabela 3.10 Meios utilizados para fermentação.
- Tabela 3.11 Preparo do reagente de Somogyi-Nelson I.
- Tabela 4.1 Produção de tacrolimo, biomassa e específica da obtenção do tacrolimo.
- Tabela 4.2 Extração preliminar do composto oleoso produzido via fermentação utilizando maltose como fonte de carbono.
- Tabela 4.3 Pré-purificação do tacrolimo com diferentes fontes de carbono.
- Tabela 4.4 Estudo preliminar da temperatura e porcentagem de água na fase móvel (150 mg/L de tacrolimo padrão, vazão de 5 mL/min e *loop* de 20 µL).
- Tabela 4.5 Valores de entalpia de adsorção do tacrolimo em coluna analítica C18.

- Tabela 4.6 Rendimentos da purificação do tacrolimo para fermentações utilizando diferentes amostras pré-purificadas (APP).
- Tabela 4.7 Comparação dos picos endotérmicos de DSC da literatura.
- Tabela A.1 Características da sílica C18.
- Tabela A.2 Dimensões da coluna C18.
- Tabela B.1 Dimensões da coluna NH₂.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Octadecilsilano
C4	Butilsilano
C8	Octilsilano
CL	Concentração letal
CLAE	Cromatográfica líquida de alta eficiência
CN	Cianopropilsilano
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.
DCW	Do inglês <i>dry cell weight</i>
DO ₆₀₀	Densidade ótica avaliada a 600nm
DSC	Do inglês <i>differential scanning calorimetry</i>
DSMZ	Do alemão <i>deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen</i>
DTG	Do inglês <i>differential thermogravimetry analysis</i>
EMA	Do inglês <i>European Medicines Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês <i>Food And Drug Administration</i>
FE	Fase estacionária
FK-506	Tacrolimo
FK506D	37,38-dihidro-tacrolimo
FK-520	Ascomicina
FK-523	Meridamicina
FL	Fase leve
APP	Amostra pré-purificada
FM	Fase móvel
FN	Fase normal
FR	Fase reversa

FR-900506	Tacrolimo
FT-IR	Do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GDO	Glicose Oxidase
GYM	Do inglês <i>Glucose, yeast extract, malt extract</i>
HILIC	Do inglês <i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>
HPLC	Do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	Do inglês <i>International Council For Harmonisation</i>
OCB	Óleo de castanha-do-brasil
PA	Do inglês <i>pro analyze</i>
LEBBPOR	Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renováveis.
PMAC	Programa de Medicamentos de Alto Custo
PEDVB	Poli (estireno-co-divinilbenzeno)
PMP	Por milhão de população
POD	Peroxidase
PVC	Policloreto de vinila
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes
RBT	Registro Brasileiro De Transplantes
SUS	Sistema Público de Saúde
TGA	Do inglês <i>thermogravimetry analysis</i>
TTBB	1,3,5-tri-terc-butilbenzeno
UV-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolos latinos

A	Área	$[L^{-2}]$
C	Concentração do soluto na fase móvel	$[ML^{-3}]$
C_{col}	Concentração de tacrolimo do material coletado	$[ML^{-3}]$
C_{inj}	Concentração de tacrolimo injetado	$[ML^{-3}]$
C_{SN}	Concentração de tacrolimo no sobrenadante	$[ML^{-3}]$
C_{Tac}	Concentração do tacrolimo no caldo fermentado	$[ML^{-3}]$
d_C	Diâmetro da coluna	$[L]$
d_p	Diâmetro de partícula do adsorvente	$[L]$
$HETP$	Altura equivalente do prato teórico	$[L]$
k_i	Fator de retenção	Adimensional
k_j	Fator de retenção	Adimensional
L	Comprimento do leito	$[L]$
M	Massa molar do soluto	$[MM^{-1}]$
M_s	Massa molecular do solvente	$[MM^{-1}]$
N	Número de pratos	Adimensional
N_{inj}	Número de injeções	Adimensional
Q	Vazão	$[L^3T^{-1}]$
R	Constante dos gases	$[L^2T^{-2}\theta^{-1}]$
R_S	Resolução	Adimensional
T	Temperatura	$[\theta]$
t_{col}	Tempo de coleta	$[T]$
t_{inj}	Tempo de injeção	$[T]$
t_M	Tempo morto	$[T]$

t_R	Tempo de retenção total	$[T]$
t'_R	Tempo de retenção corrigido	$[T]$
U	Velocidade superficial	$[LT^{-1}]$
V	Velocidade intersticial	$[LT^{-1}]$
V_{AM}	Volume da amostra retirada do caldo fermentado	$[L^3]$
V_C	Volume total coluna	$[L^3]$
V_{col}	Volume coletado	$[L^3]$
V_{inj}	Volume injetado	$[L^3]$
V_{SN}	Volume do sobrenadante	$[L^3]$
w_h	Largura do pico à meia altura	$[L]$

SÍMBOLOS GREGOS

α	Seletividade	Adimensional
ε	Fração de vazios	Adimensional
ε_p	Porosidade partícula	Adimensional
ε_T	Porosidade total	Adimensional
ρ	Massa específica	$[ML^{-3}]$
σ	Desvio padrão	Adimensional
σ^2	Variância	Adimensional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA	21
1.2 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	23
1.3 OBJETIVO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL	27
2.1.1 Custos com saúde pública	27
2.1.2 Transplantes no Brasil	29
2.1.3 Uso do tacrolimo em outras terapias	33
2.2 TACROLIMO	34
2.2.1 Aspectos gerais e características físico-químicas do tacrolimo	34
2.2.2 Mecanismo de ação	36
2.2.3 Reação de epimerização	37
2.3 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO	39
2.3.1 Síntese orgânica do tacrolimo	39
2.3.2 Biossíntese do tacrolimo e coprodutos	40
2.3.3 Avanços na produção de tacrolimo via biossíntese	42
2.3.4 Recuperação e purificação do tacrolimo	43
2.4 CROMATOGRAFIA	49
2.4.1 Introdução à cromatografia	49
2.4.2 Fase estacionária para cromatografia preparativa	51
2.4.3 Fase móvel para escala preparativa	54
2.4.4 Adsorventes e recursos usados na produção e quantificação do tacrolimo	54
2.4.5 Parâmetros cromatográficos	56

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O TACROLIMO	60
2.5.1 Kino <i>et al.</i> (1987a).....	60
2.5.2 Okuhara <i>et al.</i> (1990).....	61
2.5.3 Nishihara <i>et al.</i> (2002)	61
2.5.4 Higaki <i>et al.</i> (2003).....	61
2.5.5 Keri <i>et al.</i> (2005).....	61
2.5.6 Kumar <i>et al.</i> (2007).....	61
2.5.7 Buchta <i>et al.</i> (2008)	61
2.5.8 Cabri <i>et al.</i> (2008)	62
2.5.9 Cvak <i>et al.</i> (2008).....	62
2.5.10 Patil <i>et al.</i> (2009).....	62
2.5.11 Choi <i>et al.</i> (2013)	62
3. MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	63
3.1.1 Cepa de bactérias <i>Streptomyces tsukubaensis</i> e padrão de tacrolimo	63
3.1.2 Cultivo em placa, pré-inoculação, inoculação e fermentação	64
3.1.3 Cromatógrafo e sistema de aquecimento.....	66
3.1.4 Evaporador.....	67
3.1.5 Colunas, adsorventes e meios filtrantes	67
3.1.6 Padrões utilizados na determinação da porosidade e fração de vazios.....	68
3.1.7 Solventes empregados na purificação e quantificação do tacrolimo	69
3.1.8 Quantificação de açúcares redutores e proteínas totais.....	69
3.2 MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE TACROLIMO	70
3.2.1 Placa de Petri e tubos criogênicos	70
3.2.2 Pré-inoculação e inoculação.....	71

3.2.3	Fermentação	71
3.3	ESTRATÉGIA PARA A PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO	72
3.3.1	Pré-purificação	72
3.3.2	Etapas de purificação	73
3.3.3	Cristalização do tacrolimo	74
3.4	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO	74
3.4.1	Quantificação da biomassa	74
3.4.2	Quantificação de tacrolimo	74
3.4.3	Quantificação de proteínas totais	76
3.4.4	Quantificação de açúcares redutores	78
3.5	ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA	80
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
4.1	PRÉ-PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO	81
4.1.1	Fermentação	81
4.1.2	Etapas do processo de pré-purificação	86
4.1.3	Definição das etapas do processo de pré-purificação	90
4.2	PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO	93
4.2.1	Definição das fases estacionárias	93
4.2.2	Purificação do tacrolimo por cromatografia	101
4.3	PROCESSO COMPLETO DE OBTENÇÃO DO TACROLIMO	106
4.3.1	Processamento do tacrolimo	106
4.3.2	Avanços no processo de purificação do tacrolimo	110
5.	CONCLUSÕES	114
6.	TRABALHOS FUTUROS	116
6.1	Fermentação	116

6.2 Pré-purificação	116
6.3 Purificação	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
APÊNDICES	138

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

A era moderna dos transplantes teve início no ano de 1950 com o transplante de órgãos não regeneráveis e o desenvolvimento de novas técnicas de sutura dos vasos sanguíneos. Desde então se estabeleceu forte relação entre transplantes de órgãos e imunossupressão clínica. O primeiro imunossupressor utilizado foi a cortisona, mas sua gama de efeitos colaterais como, por exemplo, osteoporose, obesidade e perda de massa muscular limitou seu uso. Entre 1960 e 1986 utilizaram-se agentes antiproliferativos (azatioprina) e corticoides (prednisona) como base da terapia clínica. No entanto, tais drogas apresentavam respostas inadequadas de imunossupressão e alto índice de rejeição aguda (Abbud Filho e Ramalho, 1997; Garcia *et al.*, 2004).

Em 1980 a introdução da ciclosporina no mercado americano, como base da terapia, representou um marco na evolução da imunossupressão, mesmo o fármaco apresentando possíveis efeitos colaterais como: nefrotoxicidade crônica, hipertensão arterial, síndrome urêmica hemolítica, hipercolesterolemia, severa hipertricose, hipertrofia gengival, hirsutismo e diabetes. A partir de 1990 novas drogas descobertas, como o tacrolimo e o sirolimo, foram incorporadas neste mercado. Inibidores de calcineurina, como a ciclosporina e o tacrolimo, passaram a ser usados como base do protocolo de terapia de imunossupressão clínica (Abbud Filho e Ramalho, 1997; Garcia *et al.*, 2004).

O tacrolimo, cuja representação da estrutura molecular 3D encontra-se apresentada na Figura 1.1, foi o primeiro fármaco da nova classe de imunossupressores derivados de macrolídeo. A descoberta se deu pela reação de linfócitos misturados a um sistema de rastreio composto por moléculas isoladas do caldo obtido por fermentação a partir da *Streptomyces tsukubaensis*. A bactéria foi recolhida no solo na base do monte Tsukuba,

localizado próxima à cidade de Tóquio (Kino *et al.*, 1987a; Kino *et al.*, 1987b; Tanaka *et al.*, 1987).

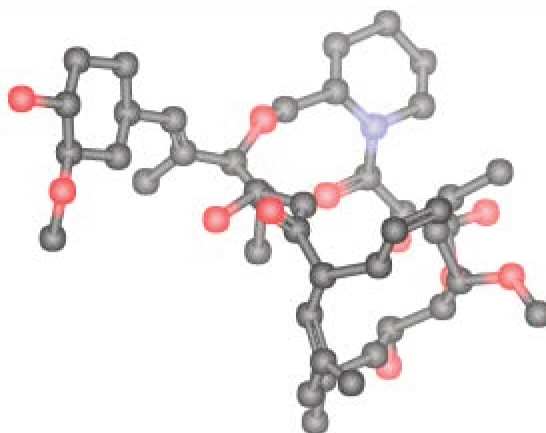


Figura 1.1 – Fórmula molecular tridimensional do tacrolimo.

A descoberta do tacrolimo ocorreu em 1984 pela equipe da Fujisawa Pharmaceutical Co. Em abril de 2005, a empresa fundiu-se com a também japonesa Yamanouchi Pharmaceutical Co para formar a Astellas Pharma Inc. Os produtos à base de tacrolimo comercializados pela Astella Pharma são o Prograf[®], Advagraf[®], Graceptor[®], ASTRAGRAF XL[®], Prograf XL[®] e Protopic[®]. De acordo com o relatório anual da Astella Pharma Inc. as vendas de Prograf[®] em 2015 geraram uma receita de US\$ 1,723 bilhão. Em 2016 este valor subiu para US\$ 1,801 bilhão representando 14,8% das vendas (Hatanaka 2017).

O primeiro país a utilizar o tacrolimo foi o Japão em 1993. Em abril de 1994 o fármaco foi aceito para terapia de resgate ou como agente de imunossupressão de primeira linha nas jurisdições dos Estados Unidos (Chaudhari *et al.*, 2012).

No continente europeu, doze centros de diversos países europeus, entre eles Áustria, França, Alemanha, Itália, Espanha, Suécia e os países que constituem o Reino Unido, participaram dos estudos de fase II e III em adultos. Os resultados obtidos serviram de suporte, em abril de 2007, para a aprovação do tacrolimo em terapias de imunossupressão pela *European Medicines Agency* (EMA).

Em junho de 2002 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a comercialização do tacrolimo no Brasil (BRASIL. Portaria SAS/MS 221 do Ministério da Saúde, 2002; CONITEC, 2015a).

O tacrolimo tornou-se significativo em terapias de imunossupressão e no tratamento de diversas doenças mediadas imunologicamente. Várias vantagens fundamentais tornaram o fármaco uma alternativa para muitos pacientes que utilizavam a ciclosporina, especialmente crianças e mulheres. Dentre os benefícios estão a falta de hiperplasia gengival, ausência de hipertricoses, menor incidência de hipertensão e hiperlipidemia. Além disso, o tacrolimo impulsionou uma nova era no tratamento de doenças de pele imunomediadas, visto sua eficiência em uso tópico (Amaya *et al.*, 2009).

1.2 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

O Brasil possui o maior programa público de transplantes de órgãos do mundo, e o segundo maior em número absoluto de transplantes renais e hepáticos. O Sistema Público de Saúde (SUS) é responsável por aproximadamente 95% dos transplantes e fornece assistência integral ao transplantado (Garcia e Pacheco, 2017a). O artigo 2º da Lei federal nº 9.434 de fevereiro de 1997 autoriza a realização do transplante de órgãos somente em estabelecimentos de saúde e médico-cirúrgicas de remoção e transplante permitidos pelo órgão de gestão nacional do SUS.

Apesar de o programa ser bem consolidado, a taxa de transplantes realizados no Brasil, embora crescente, tem sido limitada pelo número de doadores. Os principais problemas enfrentados são a recusa familiar e a não comunicação dos casos sobre morte encefálica (Guerra Júnior, 2010; Garcia e Pacheco, 2017a).

Em 2002, foram estabelecidos protocolos e diretrizes terapêuticas para o uso de medicamentos excepcionais e de alto custo pelo SUS. Destaca-se que de acordo com a Portaria GM nº 2.577 de 2006, o Programa de Medicamentos de Alto Custo (PMAC) do Ministério da Saúde fornece todo o tratamento farmacoterapêutico para pacientes com indicação de uso de medicamento de alto valor unitário ou para terapias crônicas de custo elevado (BRASIL, Portaria GM nº 2.577, 2006; Brandão *et al.*, 2011).

O tacrolimo, um dos principais fármacos do PMAC, é utilizado em diferentes terapias de imunossupressão de primeira linha e em casos de resgate de enxertos. Em uma

pesquisa prévia realizada na cidade de Campinas-SP, local onde se situa o Hospital de Clínicas da Unicamp, que é um dos principais centros de transplantes do país (Lucilius e Roque, 2017), 100 cápsulas do fármaco com 1 mg cada apresentou o custo entre R\$ 680,00 e R\$ 1234,00. O alto valor do medicamento está relacionado a uma série de fatores, entre as questões técnicas se destacam: a produção do fármaco não ser bem consolidada no país, baixa produção específica do tacrolimo na fermentação e processo de purificação complexo.

O laboratório nacional Libbs Farmacêutica e a Fiocruz, por meio do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da Fiocruz assinaram, em agosto de 2010, um contrato de transferência de tecnologia para a produção do medicamento. Estimou-se que tal acordo geraria uma economia de mais de R\$ 240 milhões para os cofres públicos, além do fortalecimento do Complexo Econômico Industrial da Saúde no Brasil e das parcerias para o desenvolvimento produtivo (Fiocruz, 2010).

Em março de 2012 o primeiro lote do medicamento foi produzido, 6,6 milhões de cápsulas do tacrolimo de 1mg (Fiocruz, 2012). Em maio de 2017, foram iniciadas as adequações no Complexo Tecnológico de Medicamentos (CTM) com a previsão de que toda a obra de adequação da área fabril viesse a ser concluída em março do ano 2018. No entanto, a liberação da linha de fabricação do tacrolimo foi liberada em setembro de 2017 (Matos, 2017).

A partir de setembro de 2017, vários veículos da imprensa nacional reportaram a falta do tacrolimo em 7 estados brasileiros, entre eles São Paulo, onde vivem 40% dos transplantados. Em resposta, o Ministério da Saúde alegou que, em novembro de 2017, realizou a compra de tacrolimo (1mg e 5mg) e micofenolato de sódio (180mg e 360mg), utilizados na terapia de imunossupressão. O Ministério reforçou que, além de garantir a assistência aos pacientes, a pasta conseguiu baixar o custo dos imunossupressores tacrolimo e micofenolato de sódio. No entanto, no caso do tacrolimo, houve uma decisão judicial encerrando a Parceria de Desenvolvimento Produtivo que produzia e fornecia o medicamento ao Ministério. Para garantir a sua oferta, foi feito um novo processo de compra (Maciel, 2017).

A demanda crescente de transplante de órgão sempre estimulou o mercado de drogas imunossupressoras, visto a necessidade contínua e vital do fármaco aos pacientes. O

principal meio de produção do tacrolimo é via fermentação através da *Streptomyces* sp. Devido à relevância clínica e comercial, vários grupos de pesquisa desenvolveram diferentes estratégias para aumentar a produção do fármaco (Singh e Behera 2009; Jung *et al.*, 2009; Martinez-Castro *et al.* 2011; Chen *et al.*, 2012, Kosec *et al.*, 2012; Mishra e Verma, 2012; Xia *et al.*, 2013; Martinez-Castro *et al.* 2013; Sun e Ye 2016 e Wang *et al.* 2017, Moreira, 2018).

Do ponto de vista técnico econômico, o custo de obtenção do fármaco é alavancado pelo processo de purificação que, além dos desafios convencionais de bioprocessos para fármacos, ainda conta com limitações específicas. No processo de produção via *Streptomyces* sp., por exemplo, são coproduzidos outros macrolídeos com estrutura molecular muito semelhante ao tacrolimo como, por exemplo, a ascomicina e a meridamicina (Jung *et al.*, 2011).

Outro ponto importante é a relação delicada do tacrolimo com a água, presente em todos os processos, principalmente ao final da purificação. Mesmo o tacrolimo sendo totalmente isolado de outros compostos, o fármaco deve ser cristalizado para garantir que não ocorra reação de epimerização promovida pela água. Caso contrário, o fármaco totalmente isolado pode ter a pureza reduzida pela formação dos epímeros diol e C10, denominados pela literatura de tautômeros I e II, respectivamente (Namiki *et al.*, 1993; Namiki *et al.*, 1995; Akashi *et al.*, 1996; Ferraboschi *et al.*, 2012; Peterka *et al.*, 2015).

O primeiro trabalho divulgado sobre o processo de purificação foi de Kino *et al.* (1987a). Desde então, outros processos foram propostos (Okuhara *et al.*, 1990; Nishihara *et al.*, 2002; Higaki *et al.*, 2003; Keri *et al.*; 2005; Cvak *et al.*, 2008; Cabri *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2013). Em todos os casos, são utilizadas diversas separações cromatográficas e cristalizações, aumentando o custo do processo, e, em alguns casos, diminuindo drasticamente o rendimento final.

1.3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um processo completo para a recuperação e purificação do tacrolimo proveniente de através de fermentação com *Streptomyces tsukubaensis*.

No desenvolvimento da rota de purificação do fármaco foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Determinação do método de quantificação do tacrolimo por técnicas de cromatografia líquida.
- Estudo preliminar da fermentação em incubadora agitada para determinar o tempo de fermentação, temperatura e agitação.
- Obtenção de diferentes caldos fermentados em fermentador no volume de 1 litro para o estudo de purificação.
- Estudo preliminar do processo de purificação para se estabelecer as estratégias usadas na pré-purificação e purificação.
- Selecionar os solventes para a extração do tacrolimo.
- Escolher adsorventes utilizados na pré-purificação.
- Determinar a sequência das operações cromatográficas para o processo de purificação através da escolha de fases estacionárias e os solventes mais adequados para a purificação com alta pureza do tacrolimo.
- Determinar uma rota de cristalização do tacrolimo, na qual não ocorresse a reação de epimerização do tacrolimo em diol e C10 (tautômero I e II).

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No capítulo 2 são apresentadas informações relacionadas ao tacrolimo. Dentre os assuntos abordados destacam-se: o cenário de transplante e custos com saúde no Brasil, características físico-químicas, biológicas, produtivas e de purificação do tacrolimo, e a cromatografia líquida adsorbtiva, uma importante técnica para a purificação do fármaco.

2.1 SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL

2.1.1 Custos com saúde pública

No Brasil, a gestão federal da saúde é realizada por meio do Ministério da Saúde. Tradicionalmente, o órgão é responsável pela metade de todos os recursos gastos no país em saúde pública e a outra metade é subsidiada pelos estados e municípios. A responsabilidade do controle e do monitoramento dos transplantes de órgãos é do Sistema Nacional de Transplantes (SNT), criado pelo Decreto nº 2.268, de 30 de junho de 1997. Suas atribuições incluem a gestão política, promoção da doação, logística, credenciamento das equipes e hospitais para a realização de transplantes, definição do financiamento, e elaboração de portarias que regulamentam todo o processo.

A seguir são apresentados os gastos públicos em saúde no período de 2002 a 2016. Os dados foram obtidos no Sistema de Informações sobre Orçamentos Públicos em Saúde (SIOPS) do *site* do Ministério da Saúde no setor de gastos da união. Na Figura 2.1 nota-se a evolução dos gastos com suporte profilático e terapêuticos, que representou entre 10 e 12% dos gastos totais com saúde pública. Desta porcentagem, 89% foi gasto apenas em despesas com medicamentos, como mostrado na Figura 2.1b.

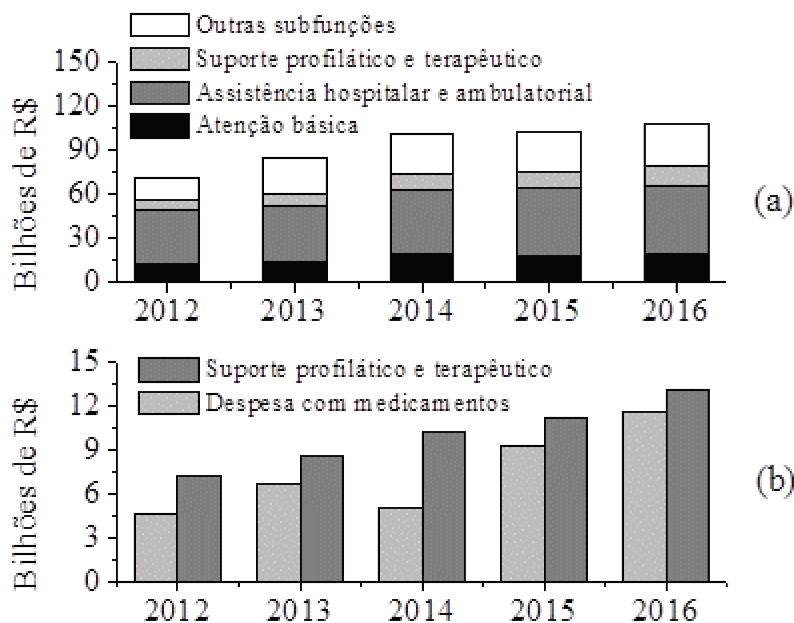


Figura 2.1 – (a) Gastos públicos com saúde no Brasil; e (b) Relação de gastos com suporte profilático e terapêutico, e despesas com medicamentos.

Fonte: Ministério da Saúde.

Tal tendência nas despesas com medicamentos já havia sido reportado em um estudo em conjunto realizado por três instituições, entre elas a Fiocruz, na qual analisaram as compras realizadas pelo Governo Federal no período compreendido entre janeiro de 2006 e dezembro de 2013 (Maia *et al.*, 2017). Neste período foram investidos R\$ 34 bilhões em medicamentos. Destaca-se que deste total gastou-se R\$ 12 bilhões apenas no ano de 2017. De acordo com tal pesquisa, 50% desse valor total foram destinados a três classes de medicamentos: os imunossupressores, os antivirais de uso sistêmico e os agentes antineoplásicos. Os imunossupressores encabeçam a lista dos medicamentos que mais tiveram aumento na despesa, correspondendo a uma elevação de 250 vezes entre 2006 e 2013 (Luz *et al.*, 2017).

Luz *et al.* (2017) também citam que os principais fatores que impactam no aumento das despesas com produtos farmacêuticos em um país são os altos preços de compra e a elevada demanda do fármaco, ou uma combinação dos dois. Isso é corroborado pelos relatórios do Comitê Nacional de Incorporação de Tecnologia de Saúde do SUS (CONITEC). De acordo com esses relatórios, 60% dos medicamentos incorporados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) de 2012 a 2016 eram produtos de alto preço.

2.1.2 Transplantes no Brasil

Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO) o sistema de transplantes do Brasil é bem consolidado e regulado, e conta com o apoio do setor público aos programas. De acordo com os dados obtidos, entre o período de 2009 e 2016, pelo RBT há melhora progressiva nos resultados dos transplantes. O número de doadores efetivos aumentou de 6,5 pmp (por milhão de população) em 2006 para 14,6 pmp em 2016, como apresenta na Figura 2.2 (Garcia e Pacheco, 2014; Garcia e Pacheco, 2017a).

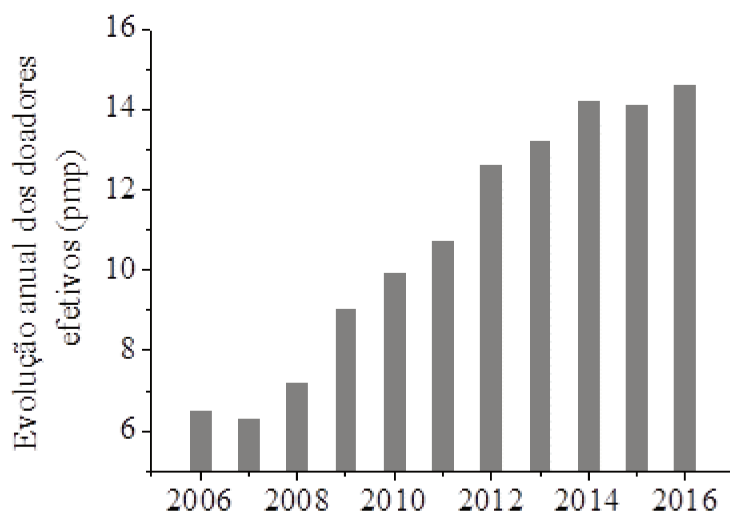


Figura 2.2 –Evolução anual dos doadores efetivos no Brasil.
Fonte: Garcia e Pacheco, 2014; Garcia e Pacheco, 2017a.

Apenas na cidade de Campinas, no Hospital das Clínicas da Unicamp, foram realizados mais de 6700 transplantes no período entre 1984 e 2016. Na Figura 2.3 é apresentada a evolução dos transplantes desde o início do procedimento. Pode-se observar que o número de transplantes bate recordes nos dois últimos anos (Paiva, 2018). No entanto, o RBT destaca que, dentre as principais dificuldades, estão o crescimento insuficiente nas doações, elevados índices de recusa familiar à doação, e baixo índice de notificações de morte encefálica.

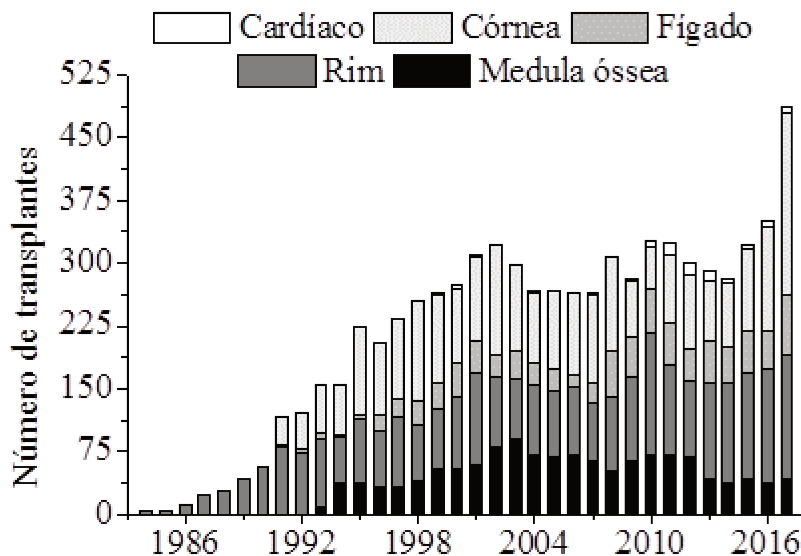


Figura 2.3 – Transplantes realizados no Hospital de Clínicas da Unicamp.
Fonte: Paiva, 2018.

Na Figura 2.4a observa-se a discrepância entre os potenciais doadores, a recusa familiar e o número efetivo de transplantes. Este cenário ainda se agrava quando há desfalque na necessidade de doadores.

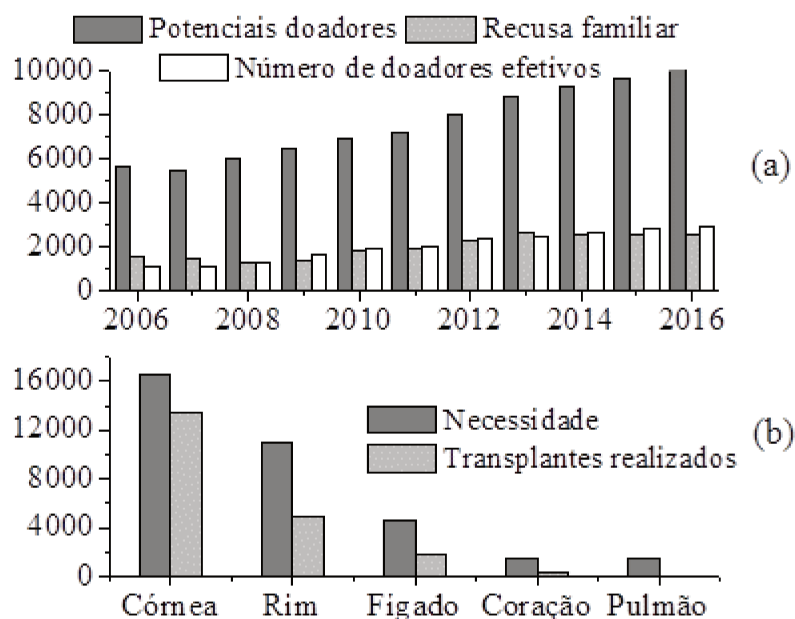


Figura 2.4 – (a) Potenciais doadores de órgãos no país; e (b) Necessidade Estimada e número de transplantes realizados no Brasil em 2016.
Fonte: Garcia e Pacheco, 2014; Garcia e Pacheco, 2017a, Garcia e Pacheco, 2017b.

A Figura 2.4b retrata os dados de 2016 no comparativo da demanda em relação aos transplantes concretizados (Garcia e Pacheco, 2014; Garcia e Pacheco, 2017a, Garcia e Pacheco, 2017b).

A Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) foi criada pela lei nº 12.401 de 28 de abril de 2011 com objetivo de assessorar o Ministério da Saúde nas atribuições relativas à incorporação, exclusão ou alteração de tecnologias em saúde pelo SUS. De acordo com a CONITEC o tacrolimo é o fármaco mais recomendado para a terapia do tratamento de transplante renal e hepático, sendo a ciclosporina indicada quando há contraindicação do tacrolimo (BRASIL, Portaria SAS/MS nº 712, 2014; BRASIL, Portaria conjunta nº 5, 2017).

Com exceção do transplante de córnea, todos outros transplantes possuem como base um inibidor de calcineurina, como o tacrolimo e a ciclosporina. Na terapia de imunossupressão do transplante de córnea são utilizados outros métodos para induzir a apoptose dos linfócitos T como, por exemplo, o uso de pulsoterapia com metilprednisona (Costa *et al.*, 2008). No entanto, há estudos que demonstram que o colírio de tacrolimo associado à prednisolona tópica aumenta a sobrevida da córnea doada em pacientes de alto risco (Dhaliwal *et al.*, 2008; Magalhães, 2013).

A calcineurina é uma proteína serina/treonina fosfatase dependente de cálcio e calmodulina. Tal proteína é responsável pela ativação das células T do sistema imunológico através do fator de transcrição nuclear. A calcineurina é o alvo de uma classe de medicamentos chamados inibidores da calcineurina, que inclui ciclosporina, voclosporina, pimecrolimo e tacrolimo (Liu *et al.*, 2005; Paier, 2014).

A CONITEC encomendou diversos relatórios com relação aos custos e efetividade do tacrolimo em relação à ciclosporina nas terapias de imunossupressão posterior a 2008. Foi demonstrado que, em todos os casos, houve evidências de que a efetividade do tacrolimo é similar à ciclosporina. Além disso, o fármaco se mostrou sempre como alternativa para o tratamento (CONITEC, 2015a; CONITEC, 2015b; CONITEC, 2016a; CONITEC, 2016b; CONITEC, 2016c).

Em relação ao custo da terapia para o SUS os resultados devem ser observados de acordo com o tipo de transplante. No caso de transplantes cardíacos, a terapia com o tacrolimo se mostrou entre 6% e 33% mais cara que o tratamento com ciclosporina. No

entanto, o impacto orçamentário total se encontra autolimitado pela própria escassez de órgãos e não no tratamento de primeira linha prestado ao receptor do enxerto. Portanto, o tacrolimo é uma alternativa terapêutica eficiente (CONITEC, 2015a).

Para transplante de pulmão o tacrolimo apresentou custo 100% maior que a terapia com ciclosporina (R\$ 15.709,23 *versus* tacrolimo R\$ 33.492,63 por paciente). Entretanto, o tacrolimo foi recomendado como terapia de resgate para uso em pacientes submetidos a transplante de pulmão, em tratamento de manutenção, resistentes ou intolerantes à ciclosporina, de acordo com critérios que deverão ser estabelecidos em Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde (CONITEC, 2016a).

Na terapia do transplante de pâncreas, o tacrolimo diminui a ocorrência e a gravidade de episódios de rejeição refratária e eventos adversos. No caso de tratamentos terapêuticos com tacrolimo em dose reduzida e sirolimo podem ser resgatados de 2 a 5% de repetitivos episódios tóxicos de rejeição refratária grave (CONITEC, 2016c),

Sirolimo, também conhecido por rapamicina, é um imunossupressor de rápida absorção oral e é submetido ao metabolismo intestinal e hepático por um sistema de cooperação que inclui a glicoproteína-P e as enzimas do citocromo CYP3A (Oliveira *et al.*, 2009). Sua estrutura molecular se trata de uma lactona macrolídea produzida por organismos da espécie *Streptomyces hygroscopicus* (Dang *et al.*, 2017; Dutta *et al.*, 2017).

O tacrolimo está consolidado em terapia de transplantes hepáticos. No entanto, a CONITEC propõe o uso combinado de tacrolimo e everolimo, pois resultaria em uma economia de até R\$ 73 milhões no período de 2015 até 2019 (CONITEC, 2015b; CONITEC, 2016b).

O everolimo é um derivado sintético do sirolimo (CONITEC, 2015a). Ambos os fármacos se ligam à mesma imunofilina intracelular que o tacrolimo (FKBP12), mas ao invés de inibir a calcineurina, o complexo droga-receptor se liga à proteína alvo da rapamicina em mamíferos. Isso causa a inibição de uma serina-treonina quinase multifuncional, impedindo o DNA e a síntese de proteínas, resultando em uma parada do ciclo celular (Webster *et al.*, 2006).

2.1.3 Uso do tacrolimo em outras terapias

Apesar de o tacrolimo ser amplamente utilizado em terapias de imunossupressão de primeira linha e de regate de enxertos, o fármaco também é utilizado em tratamentos tópicos como, por exemplo, em dermatite atópica, uveíte e vitiligo, e é continuamente testado em outros tipos de tratamentos tópicos (Chaudhari *et al.*, 2012).

Watanabe (2015) cita que inibidores de calcineurina, como o tacrolimo, se tornaram uma alternativa muito bem aceita aos corticosteroides tópicos, pois seu uso crônico não está associado com alteração da barreira da pele ou aumento da absorção percutânea e pode ser utilizado em pacientes maiores de dois anos de idade. O tacrolimo é empregado em dermatite de contato, dermatite seborreica, rosácea, lúpus eritematoso cutâneo, líquen plano, psoríase, vitiligo e outras dermatoses cutâneas.

De acordo com Lin (2012) o tacrolimo possui atividade contra outras doenças e pode ser utilizado, em alguns casos, como terapia coadjuvante. O autor reportou em sua revisão resultados favoráveis com tacrolimo para as seguintes patologias: balanite xerótica obliterante, líquen estriado, acrodermatite contínua supurativa, síndrome de Sjögren, balanite de Zoon, ictiose linear circunflexa, intertrigo, prurido na cirrose biliar primária, prurido urêmico, pênfigo foliáceo, dermatite actínica crônica, sarcoidose cutânea, granuloma anular, líquen amiloidose, eritema anular idiopático, epidermólise bolhosa, queilite esfoliativa, foliculite pustulosa eosinofílica, pustulose erosiva da perna e do couro cabeludo, pitiríase liquenoide, pênfigo paraneoplásico, lesões de pele de dermatomiosite, esclerodermia, morfeia e úlcera vasculítica.

O tacrolimo também tem se tornado expressivo na oftalmologia, tanto animal como em humanos. Os principais usos são nos casos de transplantes de córnea, como já citado, e no tratamento da ceratoconjuntivite seca (Martins, 2016).

Berdoulay *et al.*, (2005) demonstraram que a suspensão aquosa tópica de 0,02% de tacrolimo atua na produção de lágrimas em cães com ceratoconjuntivite seco e é uma alternativa promissora em relação ao travamento com ciclosporina. Al-Amri (2014) reporta que a pomada dermatológica com tacrolimo é um tratamento seguro e eficaz para os casos de ceratoconjuntivite seco refratários frente ao tratamento padrão e pode substituir os tratamentos com esteroides destinados a controlar a atividade da doença em humanos.

Sandrin e Santo (2015) revisaram as principais estratégias terapêuticas no tratamento da alergia ocular. Os autores afirmam que o tacrolimo é uma alternativa no tratamento de conjuntivite alérgica grave. Labcharoenwongs *et al.*, (2012) apresentam dados comparativos entre a ciclosporina 2% e o tacrolimo 0,1% aplicados topicamente para casos graves de alergia ocular. Apesar de eficácia similar, a sensação de queimação é mais evidente com o uso da ciclosporina.

2.2 TACROLIMO

2.2.1 Aspectos gerais e características físico-químicas do tacrolimo

O tacrolimo é um imunossupressor aprovado na profilaxia da rejeição dos receptores de transplante alogênico (transplantes entre indivíduos geneticamente diferentes, porém da mesma espécie) de fígado, pâncreas, pulmão, rim e coração e no tratamento da rejeição do transplante alogênico resistente aos tratamentos terapêuticos com outros imunossupressores (CONITEC, 2015a; CONITEC, 2015b; CONITEC 2016a; CONITEC 2016b; CONITEC 2016c).

O tacrolimo foi descoberto pela empresa farmacêutica Fujisawa Pharmaceutical Co., atual Astellas Pharma Inc. Sua primeira divulgação ocorreu em 1987 através do trabalho de Kino *et al.* intitulado de “*FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces*”. O tacrolimo foi denominado FK-506, fugimicina ou FR-900506, no entanto o nome comumente utilizado é um acrônimo da palavra inglesa *tacrolimus*, onde ‘t’ se refere ao monte Tsukuba, ‘acrol’ à palavra macrolídeo e ‘imus’ para imunossupressor. No Brasil, a nomenclatura utilizada pelo SUS e pela ANVISA para se referir ao fármaco é “tacrolimo”.

A estrutura molecular do tacrolimo foi elucidada primeiramente por Tanaka *et al.* (1987) que apresentaram a numeração de cada carbono de acordo com a Figura 2.5. A estrutura molecular é retoma visto a importância da identificação de cada carbono para compreensão a seguir das reações de epimerização e a identificação dos coprodutos formados no processo de produção que, muitas vezes, se diferenciam do tacrolimo apenas por uma pequena modificação no C-21 da molécula.

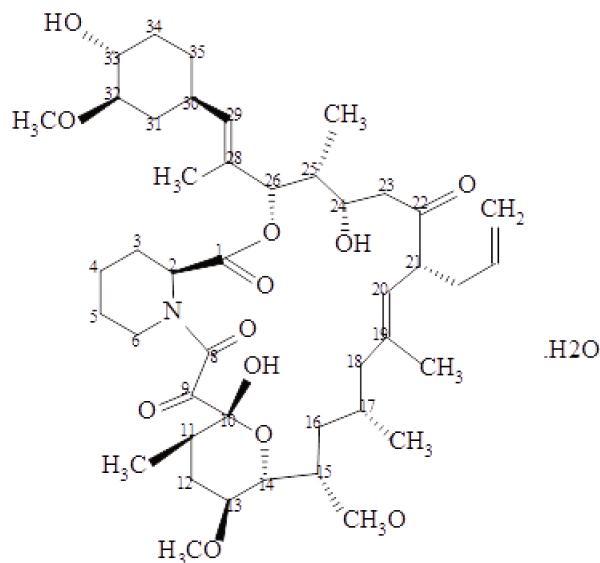


Figura 2.5 – Estrutura molecular do tacrolimo.
Fonte: Tanaka *et al.*, 1987.

Na estrutura molecular do tacrolimo são identificados grupos funcionais através de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). De acordo com Wallemacq e Reding, (1993) o espectro infravermelho (CHCL₃) mostrou a presença de grupos hidroxila (3700, 3600 e 3550 1/cm), grupos carbonila (1750, 1730 e 1710 1/cm) e um grupo amida (1650 1/cm). Namiki *et al.* (1993) observaram os seguintes estiramentos: 3400 (O–H), 1743, 1700 e 1695 (C=O), 1655 (C=O e C=C), 1195 e 1165 (C–O e C–O–C) e 1090 1/cm (de C–O–C). Hane *et al.* (1992, *apud* Yamashita *et al.*, 2003, pg. 87) especifica os estiramentos da seguinte forma: 3540 (O–H), 1740, 1725 e 1693 (C = O de éster e cetona), 1637 (C=O de cetoamida e C=C), 1194 (C-O de éster) e 1176 e 1094 1/cm (C-O-C de éter).

O tacrolimo é constituído por um macrolídeo com um α,β -dicetoamido hemiacetal, no qual incorpora um anel de 23 estruturas (Wallemacq e Reding, 1993). Os macrolídeos são compostos constituídos por um anel macrocíclico de lactona. Tal grupo apresenta a característica de agentes bacteriostáticos (antimicrobianos), que atuam pela ligação com o RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, interferindo na alongação da cadeia peptídica durante a translação e bloqueando a biossíntese de proteínas bacterianas (Guimarães *et al.*, 2010).

O tacrolimo é comercializado na forma monohidratada, C₄₄H₆₉NO₁₂. H₂O que possui massa molar de 822,03 g/mol. O fármaco é altamente solúvel em metanol, etanol,

isopropanol, acetona, acetato de etila, acetonitrila, cloreto de metileno, clorofórmio e éter dietílico. É parcialmente solúvel em hexano e éter de petróleo. Em água, o fármaco é praticamente insolúvel, sua concentração máxima, de acordo com Kino *et al.*, (1987a), é de 2 µg/mL.

A molécula é neutra, hidrofóbica e apresenta ponto de fusão entre 127°C e 129°C. Quando em temperatura ambiente o composto é um pó cristalino e incolor. Seu espectro ultravioleta tem absorção máxima a 205 nm. O tacrolimo apresenta alta estabilidade química no estado de pó cristalino. Quando submetido ao plasma ou sangue humano a concentração de tacrolimo decai cerca de 10 a 30% no período de uma semana em temperatura corporal (Wallemacq e Reding, 1993).

2.2.2 Mecanismo de ação

O fármaco é um imunossupressor da classe dos inibidores de calcineurina usado principalmente após transplante de órgão para reduzir a atividade de linfócitos T e a interleucina-2, reduzindo assim, a atividade do sistema imunológico (Amaya *et al.*, 2009).

O tacrolimo inibe os genes precoces de ativação das células T bloqueando a expressão do RNA mensageiro de várias citocinas (interleucina 2, interleucina 3, interleucina 4 e interferon-gama) e do gene c-myc. O fármaco apresenta baixa ação inibitória sobre a proteína acessória fator nuclear kappa B, que está relacionado com o baixo efeito sobre a expressão do RNA mensageiro do receptor da interleucina 2. Em adicional, o tacrolimo suprime a ligação do fator nuclear de células T ao elemento de transcrição da interleucina 2, inibindo, assim, a ativação genética e bloqueando sua produção (Abbud Filho e Ramalho, 1997).

Em estudo *in vitro* o fármaco se mostrou 100 vezes mais potente que a ciclosporina na inibição da secreção de ocitocina ativada (Kino *et al.*, 1987b). Há evidências, obtidas em estudo *in vivo* e *in vitro*, que sugerem que o tacrolimo e a ciclosporina apresentam diferentes efeitos quanto à expressão do fator de transformação do crescimento beta (proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células), expressão de p-glicoproteína (produto do gene de multirresistência a fármacos, codificada pelo gene MDR1, responsável pelo transporte de efluxo de fármacos e xenobióticos), formação de anticorpos anti-endoteliais após o transplante e potencial de

apoptose (morte celular programada que requer energia e síntese protéica para a sua execução) (Reichenspurner, 2005).

2.2.3 Reação de epimerização

A epimerização do tacrolimo foi identificada por Namiki *et al.* (1993), na qual relataram as conformações de isomeria cis e trans do fármaco. A epimerização do tacrolimo ocorre através de duas reações que produzem o epímero diol e C-10. As três formas permanecem em equilíbrio dinâmico quando em solução. Na literatura, até o presente momento, o epímero diol e C-10 foram denominados por tautômero I e tautômero II, respectivamente (Ferraboschi *et al.*, 2012; Peterka *et al.*, 2015).

O tacrolimo é uma molécula funcionalizada pelo anel macrocíclico que contém embutido em sua estrutura o tricarbonilo e o ácido pipecólico. Na primeira reação de epimerização, o tricarbonilo, ligado à estrutura de ácido pipecólico, sofre rotação restrita, quando na presença de água, o que resulta em um equilíbrio de isomeria cis e trans que afeta as ligações dos carbonos C-9, C-10 e C-14 (Namiki *et al.*, 1993; Peterka *et al.*, 2015). Na Figura 2.6 é apresentada, em destaque, a reação de epimerização do tacrolimo no epímero diol.

A segunda epimerização ocorre na estrutura cetál cíclica do tacrolimo diol, de acordo com a Figura 2.7. Em solventes polares, como a água, por exemplo, o grupo diol formado na primeira reação de epimerização sofre reação de hidratação que, por sua vez, é convertido em epímero C-10. Nota-se que a orientação espacial da hidroxila ligada ao C-10 é diferente do C-10 da molécula do tacrolimo (Peterka *et al.*, 2015).

Akashi *et al.* (1996) demonstraram que o equilíbrio entre o tacrolimo e os epímeros é influenciado pelo teor de água presente em solução. Com o aumento do teor de água, o equilíbrio tende a se deslocar a favor do tacrolimo diol, diminuindo assim, a concentração do tacrolimo e do tacrolimo C-10. Além do teor de água, foi demonstrado que o pH e a temperatura afetam a cinética de equilíbrio. Em condições de pH neutro a cinética ocorre mais rapidamente do que em pH ácido. A velocidade de reação também aumenta com o aumento da temperatura.

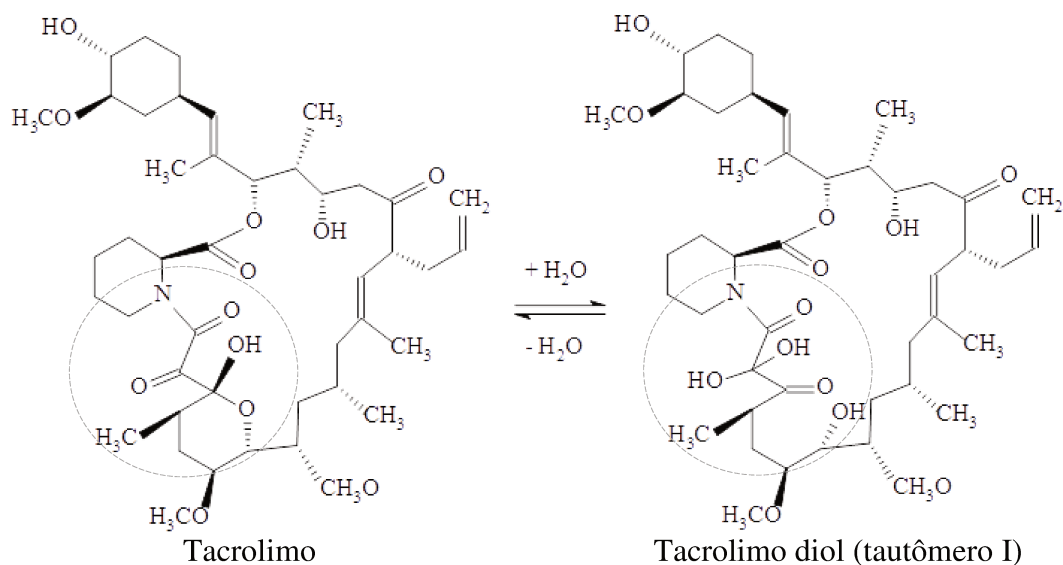


Figura 2.6 – Reação de epimerização do tacrolimo em tacrolimo diol.

Fonte: Peterka *et al.*, 2015.

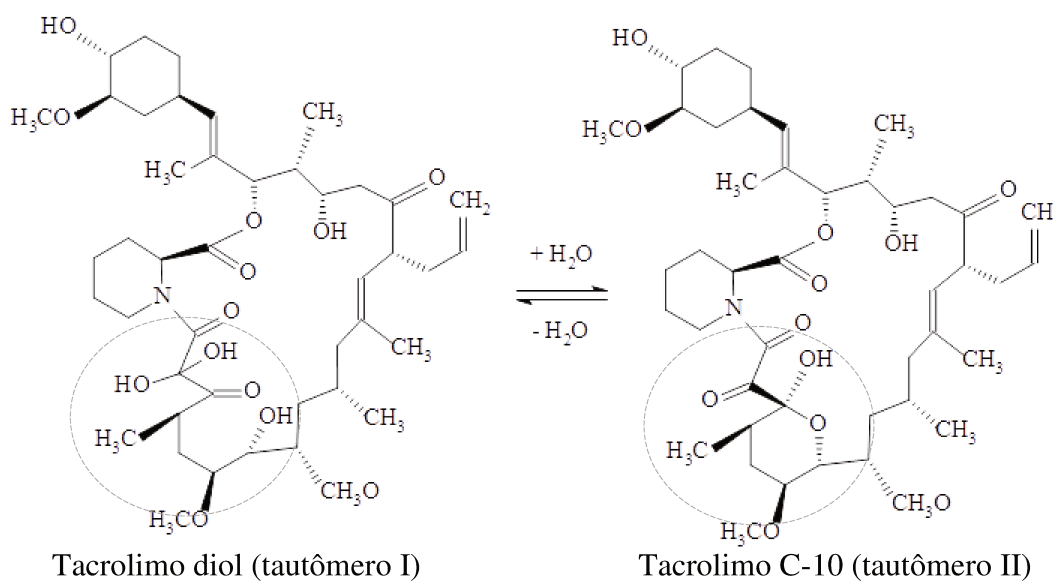


Figura 2.7 – Reação de tautomerização do tacrolimo diol para tacrolimo C-10.

Fonte: Peterka *et al.*, 2015.

De acordo com Namiki *et al.* (1995), as atividades farmacológicas dos epímeros *in vitro* apresentaram resultados semelhantes aos do tacrolimo. Os autores sugerem que os epímeros *in vivo* se comportariam como o tacrolimo e demonstrariam atividades biológicas análogas.

No entanto, Lhoëst *et al.* (1995) afirmam que o tacrolimo diol (tautômero I) apresenta potência de imunossupressão diferente do tacrolimo. Segundo os autores, a modulação da resposta imunossupressora poderia ocorrer *in vivo* por equilíbrio através da abertura e fechamento do anel envolvido na reação de epimerização.

2.3 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO

2.3.1 Síntese orgânica do tacrolimo

O tacrolimo, descoberto em 1984 e divulgado em 1987, foi produzido originalmente através da rota biosintética utilizando a *Streptomyces tsukubaensis*. Em 1990 a rota sintética formal de produção do fármaco foi primeiramente descrita por Nakatsuka *et al.* (1990) e, em seguida, por Jones *et al.* (1990) e Gu *et al.* (1990) e Ireland *et al.* (1996).

Na síntese proposta por Nakatsuka *et al.* (1990), os autores prepararam compostos intermediários em uma forma não racêmica. As principais reações de acoplamento incluíram adição seletiva de Cram do reagente de vinil Grignard derivado do brometo, reação de adição da *lithioanion of phosphonamide*, seguida por uma eliminação térmica. A *dithiane*, formada no processo, foi hidrolisada e o éster glicólico foi adicionado através de uma reação aldol que permitiu a introdução de estruturas moleculares constituídas com 8 e 9 carbonos. A elaboração do tacrolimo procedeu através de uma reação de Mukaiyama e uma sequência de redução e oxidação seletiva.

Baseados nos trabalhos iniciais, Ireland *et al.* (1997a) e Ireland *et al.* (1997b) modificaram as rotas sintéticas. No método, os autores utilizam a estratégia de acoplamento de bloco. As extremidades da molécula foram acopladas pela adição de cuprato vinílico com uma espiroenona. O α -alilo aldol foi utilizado para reduzir a abertura do sistema espiroenona. A porção α,β -dicetoamida hemiacetal instável da molécula foi preparada pelo método de geração de estágio final (*late stage generation*) e oxidação de enediol. Os segmentos médios superiores e inferiores foram derivados pelo acoplamento de subunidades menores.

Após 1997 não foram encontrados, na literatura, outros trabalhos que tratassem da rota sintética total do tacrolimo. A síntese orgânica do fármaco se mostrou altamente complexa visto que são 45 etapas em que algumas reações demoram até 12 horas. As temperaturas empregadas em cada etapa variam de -78 °C até 132 °C e o rendimento entre

50 e 99%. Além disso, foram utilizados solventes com elevado custo e tóxicos como, por exemplo, álcool lítio furfurílico, e catalizadores, como trifluoreto de boro.

2.3.2 Biossíntese do tacrolimo e coprodutos

O tacrolimo é produzido através da biossíntese de diferentes *Streptomyces* sp. As *Streptomyces* sp. são bactérias de solo com habilidade de produzir enorme quantidade de antibióticos e outros produtos naturais com grande importância nas indústrias farmacêuticas e agroquímicas (Nodari *et al.*, 2016). Na Tabela 2.1, são apresentados alguns exemplos de antibióticos produzidos por diferentes *Streptomyces* sp. (Guimarães *et al.*, 2010).

Tabela 2.1 – Antibióticos produzidos por *Streptomyces* sp.

Grupo do antibiótico	Representante	Bactéria
Aminoglicosídeo	Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>
Macrolídeos	Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>
Cloranfenicol	Cloranfenicol	<i>Streptomyces venezuela</i>
Tetraciclina	Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Lincosamida	Lincomicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Rifamicina	Rifampicina	<i>Streptomyces mediterranei</i>
Estreptogramina	Pritinamicina	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Lipodepsipeptídeo	Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>

Fonte: Guimarães *et al.*, 2010.

Na rota biosintética de produção, o tacrolimo é um metabólito secundário, portanto o fármaco é produzido apenas após o crescimento celular. Um ambiente com os nutrientes adequados é de extrema importância para alta produtividade. A *Streptomyces tsukubaensis* é capaz de catabolizar diversas fontes de carbono, como a glicose, o glicerol, o amido, e os óleos vegetais (Singh e Behera 2009; Mishra e Verma, 2012; Wang *et al.*, 2017, Moreira 2018).

Durante a fermentação, várias moléculas análogas ao tacrolimo são coproduzidas pela *Streptomyces tsukubaensis*. Nas Figuras 2.8 são apresentadas as principais estruturas coproduzidas (Jung *et al.*, 2011).

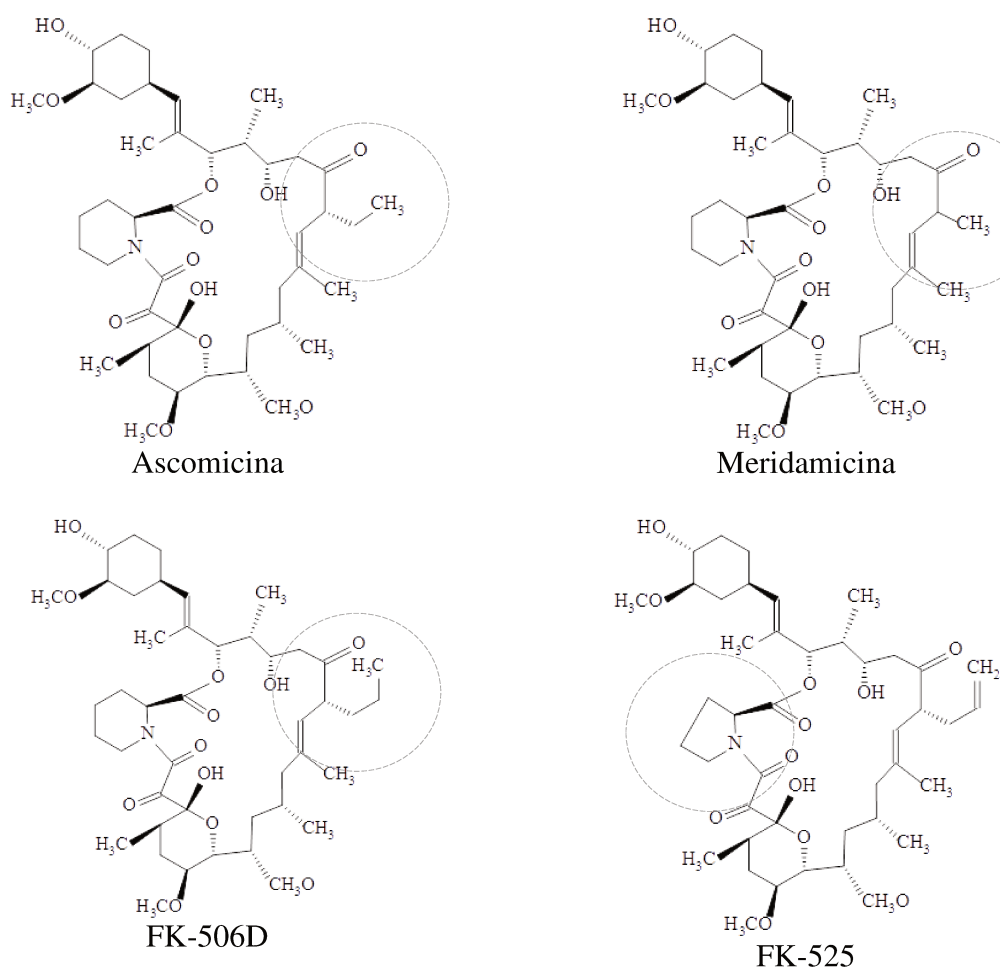


Figura 2.8 – Estruturas molecular da ascomicina, meridamicina, FK-506D e FK-525.
Fonte: Jung *et al.*, 2011.

Os principais subprodutos são ascomicina (também conhecida por FK-520), meridamicina (FK-523) e 37,38-dihidro-FK-506 (FK-506D), que diferem do FK-506 apenas na estrutura pela substituição do grupo alilo ligado ao carbono 21 pelos grupos etil, metil e propil, respectivamente. O FK-525 é obtido pela retirada do carbono 3, formando assim, o grupo funcional prolina (Askin *et al.*, 1990).

Uma proporção relativamente elevada de ascomicina foi observada nos caldos de fermentação, atingindo mais de 20% da quantidade total de tacrolimo. Em contraste, a

produção de FK-506D apresenta proporções pouco menores em comparação com tacrolimo (Chen *et al.*, 2012, Kosec *et al.*, 2012).

2.3.3 Avanços na produção de tacrolimo via biossíntese

A primeira publicação sobre a produção do tacrolimo foi realizada por Kino *et al.*, (1987a), da empresa Fujisawa Pharmaceutical Co., na primeira parte de um artigo de duas partes. No ano da aprovação do tacrolimo pela FDA, em 1994, o primeiro trabalho não pertencente ao grupo da Fujisawa Pharmaceutical Co. foi publicado por Shafiee *et al.* (1994).

O estado taxonômico da *Streptomyces tsukubaensis* e suas necessidades nutricionais foram determinados por Martinez-Castro *et al.* (2011) e Martinez-Castro *et al.* (2013). O sequenciamento genético de *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488 foi descrita por Barreiro *et al.* (2012).

Goranovič *et al.* (2012) demonstraram o papel regulador positivo dos genes (quando a função do produto do gene é a regulação da expressão de determinado gene) *fkbR* e *fkbn* na biossíntese em *S. tsukubaensis* NRRL 18488 para a produção do tacrolimo. Os autores também demonstraram os mecanismos regulatórios.

Motamedi e Shafiee (1998) e Motamedi *et al.* (1996) propuseram a rota biossintética do tacrolimo que serviu de referência para vários autores, como Singh e Behera (2009), Mishra e Verma (2012), Sun e Ye (2016), Turło *et al.* (2012) e Xia *et al.* (2013), estudarem estratégias para otimizar a produção, incluindo a utilização de diferentes fontes primárias de carbono e nitrogênio.

Turło *et al.* (2012) demonstraram que moléculas com anel heterocíclico de cinco membros com nitrogênio como um heteroátomo na sua estrutura atuam como precursoras do tacrolimo (como por exemplo, ácidos piperídico e piperínico) e agentes promotores de crescimento celular da *Streptomyces* (por exemplo, nicotinamida e ácido nicotínico) de modo a aumentar a produtividade do tacrolimo.

Também foram realizados estudos de triagem genética (Martinez-Castro *et al.*, 2009) e de engenharia metabólica (Goranovič *et al.*, 2010, Kosec *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2017) realizaram análises proteômica e metabolômica comparativas de *Streptomyces tsukubaensis* utilizando óleo de soja.

Moreira (2018) estudou a produção de tacrolimo via fermentação utilizando a *Streptomyces tsukubaensis* com as fontes primárias de carbono: maltose e glicose. De acordo com o autor, os aditivos L-lisina e ácido picolínico não desempenham papel significativo na fermentação e a razão carbono/nitrogênio mais adequada para a fermentação a 30°C foi 0,75/1. Além disso, o uso de maltose proporcionou uma produção nominal superior em relação à glicose.

2.3.4 Recuperação e purificação do tacrolimo

Os produtos de origem biotecnológica são altamente diversificados, não havendo assim um processo geral para a purificação. As operações unitárias envolvidas dependem da natureza da molécula alvo e da sua aplicação final. Produtos destinados a terapias são os que requerem maior nível de pureza. A complexidade exigida neste tipo de purificação impacta diretamente no custo final do produto.

Além dos desafios convencionais da recuperação e purificação de bioprodutos como, por exemplo, isolar uma única molécula de um meio quimicamente complexo com alta pureza, a *Streptomyces* sp. produz compostos com estrutura análoga ao tacrolimo. A seguir são descritos, em ordem de publicação, os principais trabalhos da literatura até então reportados. Com exceção de Kino *et al.* (1987a) os trabalhos foram publicados em forma de patente.

2.3.4.1 Kino *et al.* (1987a)

Kino *et al.* (1987a) foram os primeiros a relatar a produção de tacrolimo. O caldo fermentado (1300 L) foi filtrado e o tacrolimo produzido extraído com acetona. Em seguida, a solução foi eluída em coluna recheada com resina não iônica (DIAION[®] HP-20). A coluna foi condicionada previamente com água e acetona e, posterior a eluição, lavou-se a coluna com solução aquosa de acetona de 75%. A solução coletada da coluna foi evaporada até formar óleo (300 L). O óleo foi extraído com acetato de etila e separado por decantação. Ao extrato (acetato de etila) adicionou-se sílica gel (sílica especial grau 12, Fuji Devison Co.) na proporção de duas vezes a massa. A pasta formada foi evaporada até um pó seco. Subintende-se que o pó seco foi resolubilizado em algum solvente para ser purificado em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel (sílica especial grau 12,

Fuji Devison Co.) utilizando fase móvel composta por hexano e acetato de etila na proporção volumétrica 4/1 (30 L). As bandas cromatográficas coletadas foram concentradas por evaporação até formar um novo pó. O procedimento (adicionar acetato de etila e sílica gel, e utilizar o sistema cromatográfico) foi repetido algumas vezes. Após as repetições formou-se o óleo amarelo de volume e concentração não especificados. O óleo foi solubilizado em 300 mL de acetato de etila e hexano na proporção 1:1. Uma nova separação cromatográfica foi realizada em coluna de 2 L, empacotada com uma fase estacionária de sílica gel (230~400 mesh, Merk Co., Ltd.). Foram utilizadas três fases móveis diferentes: hexano e acetato de etila (1:1, 10 L); hexano e acetato de etila (1:2, 6 L) e acetato de etila (6 L). A fração de tacrolimo foi coletada e evaporada sob vácuo formando um pó branco (34 g). O pó foi solubilizado em acetonitrila, evaporado e cristalizado a 5°C por 12 horas. O segundo sistema cromatográfico foi usado mais duas vezes até que se obteve 34 g de tacrolimo cristalizado na forma de um pó branco. O pó branco foi cristalizado com acetonitrila mais 2 vezes a 4 °C. A massa final de tacrolimo encontrada foi de 13,6 g.

2.3.4.2 Okuhara *et al.* (1990)

O autores filtraram o caldo fermentado juntamente com acetonitrila. Não há especiações de como o caldo fermentado foi obtido. A solução foi eluída através do leito de resina não iônica (DIAION[®] HP-20) e, em seguida, a solução foi purificada por cromatografia líquida (rendimento de 14%). Um material adsorativo foi misturado à fração de tacrolimo. A pasta formada foi lavada com água e acetato de etila. A solução foi evaporada sob vácuo não especificado. O extrato formado foi novamente concentrado e separado em cromatografia líquida com sílica gel (70-230 mesh). Foram utilizadas 5 fases móveis: acetato de etila e hexano nas proporções volumétricas 1:9, 1: 4, 1:1 e 2:1 e acetato de etila. As frações foram novamente recolhidas e conduzidas a outro sistema cromatográfico equipado com coluna de sílica gel (230-400mesh). Utilizaram-se fases móveis de acetato de etila e hexano nas proporções volumétricas 1:1 e 2:1 e acetato de etila puro. As frações foram recolhidas, e concentradas por evaporação. Uma terceira separação cromatográfica foi realizada com sílica gel (70-230 mesh). Por fim, o processo de separação cromatográfica foi repetido em coluna (8?×500 mm) Lichrosory S160 (Merck

Co., Ltd.) até ser obtido tacrolimo de alta pureza. Ressalta-se que não há especificação exata das dimensões da coluna Lichrosory S160. Apesar dos autores citarem tacrolimo altamente puro, nenhuma informação da porcentagem de pureza foi relatada. Os autores também não citam o grau de pureza dos solventes utilizados e as condições em que as evaporações foram conduzidas.

2.3.4.3 Nishihara *et al.* (2002)

Assim como os autores anteriores Nishihara *et al.* (2002) fizeram extração com acetonitrila, filtração e eluição em resina DIAION[®] HP-20. No método, os autores utilizaram cromatografia líquida de troca iônica (Capcell Pak SCX UG80[™], Shiseido Ltd.). A fase estacionária catiônica foi inicialmente condicionada com íons de prata e utilizou-se acetonitrila como fase móvel. As impurezas foram retidas e o tacrolimo e seus análogos foram separados. No entanto, a molécula alvo é inadequada para finalidades farmacêuticas devido à baixa pureza de 92,7%, que deveria ser ao menos de 98%.

2.3.4.4 Higaki *et al.* (2003)

Higaki *et al.* (2003) utilizaram dois processos cromatográficos para purificar o tacrolimo. No primeiro sistema, os autores utilizaram coluna recheada com resina não iônica (DIAION[®] HP20SS) e fases móveis constituídas por acetona e nitrato de prata (0,294 mol/L), e, em seguida, apenas acetona. O caldo fermentado foi purificado na mesma coluna a temperatura ambiente utilizando fase móvel de acetona e nitrato de prata em duas proporções diferentes: 50/50 e 60/40. As bandas cromatográficas coletadas no sistema cromatográfico foram misturadas e evaporadas. O material concentrado resultante da evaporação foi extraído com acetato de etila. Adicionou-se sulfato de magnésio ao acetato de etila e evaporou-se todo material até a formação de um pó. O segundo sistema cromatográfico, composto pelo leito de alumina básica ativada (AC12) e acetato de etila, foi utilizado com temperatura ambiente para a purificação final do tacrolimo. Ao longo do trabalho não foi citada a pureza final do tacrolimo ou as condições em que as evaporações foram realizadas.

2.3.4.5 Keri *et al.* (2005)

Os autores propuseram um processo de eluição em coluna que não utilizou íons de prata. Os solventes empregados como fase móvel foram tetrahydrofurano, acetonitrila e água. As resinas de sorção foram de materiais baseados em estireno-divinil-benzeno e do tipo acrílico. Além dos vários sistemas de cromatografia líquida utilizando os solventes e adsorventes citados, os autores realizaram diversas cristalizações. Os autores citam que obtiveram pureza de 99,84% em relação às impurezas do caldo fermentado, incluindo ascomicina e FK-506D. No entanto, o trabalho não menciona o método utilizado para a determinação da pureza e nem a formação de tautômeros no produto final. Tendo em vista que em mais de um sistema cromatográfico foi utilizada água na composição da fase móvel, é improvável que não tenha ocorrido reação de tautomerização do tacrolimo.

2.3.4.6 Cvak *et al.* (2008)

Cvak *et al.* (2008) utilizam cromatografia líquida, evaporação e cristalização para a purificação do tacrolimo. Os autores modificaram os seguintes adsorventes com íons de prata: óxido de alumínio, óxido de zircônio, copolímero de estireno-divinilbenzeno, sílica gel de fase reversa e sílica gel ciano. Os autores afirmam que o tacrolimo eluído pode conter íons de prata que se desprendem do leite, logo é necessária pelo menos uma etapa adicional para a remoção dos íons. A pureza relatada pelos autores é de 93% em área cromatográfica.

2.3.4.7 Cabri *et al.* (2008)

No processo proposto por Cabri *et al.* (2008) a fermentação foi encerrada com a adição de acetona (50 L) na mesma proporção do caldo fermentado e 1 kg de diatomáceas Dicalite a cada 50 L de fermentado. Após agitação em temperatura ambiente durante uma hora, a pasta formada foi filtrada. A solução transparente resultante foi misturada em 2 litros de resina adsorvente XAD16 (fabricada pela Rohm e Haas) e novamente filtrada com a adição de 6 L de acetona aquosa a 75%. A solução filtrada foi evaporada para remover a acetona e em seguida extraída com acetado de etila. O acetato de etila foi separado e evaporado até se obter um óleo. Ao óleo adicionou-se 180 g de gel de sílica (0,063-0,200

mm de Merck) e 180 mL de acetato de etila. Toda a fase líquida foi evaporada e a sílica foi empacotada em coluna. A coluna foi eluída com 4 litros de n-hexano e acetato de etila (de 75/25 em base volumétrica) e 10 litros de acetato de etila. As frações foram coletadas e evaporadas até formar 12 g do pó amarelado, do qual 8,5 g eram tacrolimo. O pó foi dissolvido em 400 mL de solução aquosa de acetona a 50% contendo 30 g de nitrato de prata (AgNO_3). A solução passou pela coluna cromatográfica C18 com partículas de 15 μm de diâmetro médio. As fases móveis utilizadas foram 1L de acetona e água (50/50 em base volumétrica) contendo 51 g de AgNO_3 , e 0,25 L de acetona e água (80/20 em base volumétrica). Na separação cromatográfica foram realizadas 7 coletas da banda cromatográfica contendo o tacrolimo, no entanto, apenas 4 foram utilizadas devido à pureza. As frações coletadas foram misturadas em 400 mL de acetato de etila e lavadas 3 vezes com água. A mistura foi evaporada e o pó seco formado foi solubilizado em acetonitrila. A solução de acetonitrila foi resfriada até 5 °C e adicionou-se 1,2 L de água no período de 13 horas. Após a filtração os autores obtiveram 7 g de tacrolimo de alta pureza (HPLC Área% > 99%). É curioso o fato de que após todos os processos, de um total de 8,5 g de tacrolimo, contidos em 12 g de pó amarelado, apenas 1,5 g tenham sido perdidos no processo, mesmo utilizando apenas 5 coletas de um total de 7 e realizando cristalização em acetonitrila, solvente no qual o tacrolimo é altamente solúvel, mesmo a baixas temperaturas.

2.3.4.8 Patil *et al.* (2009)

Patil *et al.* (2009) tratam o caldo fermentado com gás amoníaco. O caldo de fermentação 11 L contendo 1,2 g de tacrolimo foi extraído com 11 L de acetato de etila. O extrato de acetato de etila foi parcialmente concentrado por evaporação até 1,2 L. O concentrado foi resfriado até 4 °C e o gás amoníaco foi purgado através do concentrado durante 30 minutos. A solução foi filtrada usando celite como auxiliar de filtração para separar as impurezas precipitadas. O filtrado foi evaporado e se obteve 28 g do resíduo oleoso. O resíduo foi eluído em coluna de sílica gel, que não foi especificada. Utilizou-se como fase móvel acetato de etila e hexano nas proporções volumétricas 25/75, 50/50 e 75/25. As duas primeiras fases móveis foram eluídas através da coluna na proporção de 3 vezes o volume da coluna. A tacrolimo foi eluído da coluna apenas com a terceira fase

móvel. As frações contendo o produto foram reunidas e concentradas por evaporação. Neste procedimento, obteve-se 2,8 g de resíduo oleoso. O resíduo foi dissolvido em 100 mL de acetato de etila e foram adicionados 3 g de carvão ativado. A mistura foi agitada durante 20 minutos e depois filtrada. O filtrado foi concentrado por evaporação para se obter 2,7 g de resíduo oleoso. Ao resíduo, foram adicionados 2,5 mL de acetato de etila. O material foi cristalizado a 4 ° C por adição lenta de hexano. Os cristais formados foram filtrados, secos e eluídos em coluna de sílica gel (230-400 mesh) condicionada com solução de nitrato de prata. A fase móvel usada foi acetato de etila e hexano (75/25 em base volumétrica). O produto foi cristalizado como mencionado anteriormente a partir de acetato de etila e hexano. Os cristais foram filtrados e secos. A pureza cromatográfica foi superior a 99% incluindo os epímeros.

2.3.4.9 Choi *et al.* (2013)

Choi *et al.* (2013) filtraram o meio fermentativo com controle do pH (3,5) em um material adsorvente revestido por terra diatomácea. Após o procedimento formou-se um material oleoso. O tacrolimo foi extraído com metanol e concentrado sob vácuo e cristalizado por diversas vezes. O material concentrado foi diluído em cloreto de metileno e eluído em resina de óxido de alumínio (75 µm, WAKO) e em seguida em sílica gel (fase normal, 70-230 mesh, 10 L), em condições não especificadas. O material foi novamente concentrado em vácuo até 5-10% do volume inicial. O concentrado foi agitado em temperatura ambiente durante uma hora, a rotação do impelidor não foi especificada. Ao longo da agitação adicionou-se água na proporção de 1% do volume do concentrado e, em seguida, a agitou-se a solução por 6 horas a 5 °C. O pó cristalino amarelo formado foi filtrado e lavado com hexano para remover materiais coloridos e substâncias oleosas. De acordo com os autores a pureza do tacrolimo até esta etapa era de 92 até 95%. Os cristais amarelos foram solubilizados em acetonitrila, e eluídos através da coluna de adsorção hidrofóbica baseada em poliestireno e divinilbenzeno (Amberchrom CG161M). O material coletado foi evaporado e separado novamente por cromatografia líquida utilizando o material adsorvente. Foi utilizada uma coluna com o mesmo adsorvente da pré-adsorção e fase móvel de acetonitrila e água. A fração coletada foi extraída por cloreto de metileno. Por fim o produto foi concentrado por evaporação e cristalizado. Os cristais foram

solubilizados em solvente orgânico e recristalizados. O tacrolimo foi obtido pela cristalização com um rendimento de 30-35%, e a pureza obtida foi de 98,5-99,9%.

Os trabalhos da literatura para a purificação do tacrolimo apresentados nesta Tese possuem em comum a utilização de cromatografia líquida adsortiva, evaporação e cristalização. Os processos propostos são longos e muitas vezes complexos e a maioria não especifica como que o caldo fermentado foi obtido. Além disso, é recorrente a repetição de determinadas etapas do processo.

2.4 CROMATOGRAFIA

2.4.1 Introdução à cromatografia

A cromatografia líquida adsortiva, uma das operações mais citadas para a purificação do tacrolimo, nasceu como uma técnica preparativa no final do século XIX com o botânico Mikhail Semenovich Tswett. Em 1950, o desenvolvimento de sensores que promoviam a detecção *online* e a descoberta de processos baseados na utilização de adsorventes revolucionou a cromatografia como um todo (Guiochon, 2006).

A cromatografia líquida adsortiva é fundamentada na migração diferencial de solutos entre dois meios distintos. Apesar de existirem várias classificações quanto à técnica, em separações de cunho preparativo, a cromatografia líquida e a cromatografia supercrítica são as mais relevantes, com destaque para sistemas que utilizam adsorventes particulados empacotados em coluna (Guiochon, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; conhecida como HPLC do inglês *high-performance liquid chromatography*) é uma técnica de destaque por ser robusta, seletiva, precisa e versátil. Sua principal característica é a utilização de bomba de alta pressão para eluir a fase móvel através da fase estacionária, a coluna cromatográfica.

As aplicações da CLAE são amplas e compreendem desde separações em escala analítica até a escala preparativa. A Tabela 2.2 apresenta um breve resumo da relação das colunas e parâmetros empregados em cada escala de separação. Os valores fornecidos são apenas referências, pois há certa flexibilidade nos parâmetros.

A diferenciação entre a cromatografia analítica e a preparativa não se restringe apenas a questões geométricas, mas também em relação ao objetivo pretendido e às restrições operacionais. A seleção do sistema cromatográfico consiste em definir o recheio da coluna

e a fase móvel. Tal decisão é um ponto crítico para a produtividade e economia do processo. Logo, apesar de serem semelhantes, é importante ter definido o escopo de cada escala.

Tabela 2.2 – Colunas de diferentes escalas de separação.

Escala	Diâmetro interno (mm)	Vazão (mL/min)	Produção
Analítica	4,6	1	<1 mg
Semipreparativa	10	5	1 mg - 100 mg
Semipreparativa	20-30	20-50	1 g - 5g
Preparativa	30-50	50-150	5 g - 100 g
Preparativa	50-110	100-600	0,2 kg - 2 kg

Fonte: Cox, 2010.

A diferenciação entre a cromatografia analítica e a preparativa não se restringe apenas a questões geométricas, mas também em relação ao objetivo pretendido e às restrições operacionais. A seleção do sistema cromatográfico consiste em definir o recheio da coluna e a fase móvel. Tal decisão é um ponto crítico para a produtividade e economia do processo. Logo, apesar de serem semelhantes, é importante ter definido o escopo de cada escala.

A Tabela 2.3 apresenta as restrições e os parâmetros utilizados na definição do sistema cromatográfico analítico e do preparativo (Schulte *et al.*, 2012). A escala analítica é focada em levantar informações qualitativas e quantitativas de uma amostra como, por exemplo, auxiliar o estudo de identificação de uma molécula ou determinar a concentração de um soluto. Muitas vezes é adequado que tal procedimento seja realizado de forma rápida e precisa, pois a informação obtida é utilizada para se tomar decisões, como é o caso de se encerrar uma fermentação, por exemplo. Por outro lado, a escala preparativa é voltada para a obtenção de um determinado produto com elevada pureza. Neste caso, a carga mássica aplicada à coluna e a produtividade do sistema cromatográfico tornam-se relevantes ao processo de separação em termos econômicos. Além disso, é imprescindível que o soluto não se degrade ao longo do processo.

Tabela 2.3 – Diferenças entre cromatografia analítica e preparativa.

Objetivos	Escala analítica	Escala preparativa
Restrições	Rápida geração de informação	Recuperar o produto isolado
	Amostra pode ser degradada	Garantir a integridade do produto
Parâmetros otimizáveis	Alta sensibilidade na separação	Pureza
	Tempo de retenção	Rendimento
	Velocidade	Produtividade
	Seletividade	Economia

2.4.2 Fase estacionária para cromatografia preparativa

As colunas cromatográficas são frequentemente descritas como o “coração da separação”. Compreender os fenômenos envolvidos é relevante para controlar o processo e dimensionar a separação, logo conhecer o mecanismo de interação entre os solutos e o sistema cromatográfico é fundamental. Em separações de cunho preparativo os materiais adsorptivos são os mais utilizados. Tais materiais são agrupados segundo sua composição química e princípio de interação. Os termos hidrofobicidade e hidrofiliabilidade são frequentemente empregados na caracterização dos adsorventes, enquanto que lipofiliabilidade e lipofobia são usados para o soluto. O parâmetro hidrofobicidade/hidrofiliabilidade é a combinação de diferentes princípios de interação entre a superfície do adsorvente e o soluto. As forças de interação predominantes são: ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, forças iônicas e interação π - π (Collins *et al* 2006). A Tabela 2.4 apresenta um resumo dos principais recheios adsorptivos e suas características mais importantes.

Do ponto de vista preparativo, os adsorventes são divididos em fases estacionárias genéricas, projetadas ou fases quimicamente ligadas e personalizadas (fase quimicamente ligada a um grupo muito específico). Fases estacionárias genéricas são indicadas para purificações que requerem adsorventes sem grande sofisticação e de baixo custo. Em contraste, as fases estacionárias personalizadas representam adsorventes com alta especificidade. As fases projetadas, também chamadas de “design”, são resinas com modificações químicas na superfície do adsorvente, como por exemplo, as sílicas funcionalizadas com octadecilsilano (Schulte *et al.*, 2012).

Tabela 2.4 – Tipos de adsorventes cromatográficos e os mais importantes princípios de interação.

Tipo	Exemplos de material	Interação	Separação
Fase normal	Sílica, óxido de alumínio	Ponte de hidrogênio, efeito estérico, acidez de Brönsted-Lowry, troca catiônica	Estrutura molecular
Fase reversa	Grupo alquila ou arila ligado à sílica ou polímeros	Interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
Grupos ligados a sílica	Enxofre ligado em resina	Substituição eletrofílica, dipolo, forças de van der Waals	Estrutura molecular
Fase quiral	Celulose ou amilose em sílica, polímeros e monómeros quirais em sílica	Interação estérica de três pontos	Orientação espacial
Afinidade	Proteína, corantes, peptídeos imobilizados em matriz	Bioadsorção	Estrutura molecular específico de grupo
Troca iônica	Grupos (SO_3^{2-} , COO^- , NH_3^+) ligados em sílica ou polímeros	Ligação iônica	Carga de superfície

Os primeiros adsorventes utilizados em sistemas cromatográficos eram altamente polares, enquanto a fase móvel apresentava baixa ou média polaridade. Devido a este contexto, tal tipo de fase passou a ser denominada de “normal” e o termo não caiu em desuso. As resinas usadas como fase estacionária são sílica gel, óxidos e grupos funcionais, como cianos ou diol, ligados à sílica. Os solventes tipicamente empregados nestes adsorventes são de baixa polaridade como, por exemplo, heptano e hexano (Schulte *et al.*, 2012).

Em recheios de fase normal, a superfície polar do adsorvente interage com a estrutura molecular do soluto com polaridade semelhante aos sítios ativos da fase estacionária, portanto um soluto polar apresenta maior tempo de retenção do que uma molécula apolar. Logo, a fase normal é indicada para separar solutos que se diferem em relação a seus grupos funcionais, incluindo estereoisômeros não enantioméricos (Schulte *et al.*, 2012).

Uma variação da fase normal é a cromatografia por interação hidrofílica, HILIC (do inglês *hydrophilic interaction chromatography*). Esta modalidade é classificada como cromatografia por interação hidrofílica, na qual se emprega uma fase estacionária polar e uma fase móvel menos polar, normalmente acetonitrila, metanol ou acetona com baixa porcentagem de água. Este tipo de separação tem sido denominada de cromatografia líquida de “fase reversa reversa” ou de “fase normal aquosa”. O mecanismo de separação é caracterizado pelo princípio de partição, em que uma fração da água, presente na fase móvel, é imobilizada pela fase estacionária. Os adsorventes usados são constituídos de sílica ou de suportes cromatográficos modificados ou não. O principal grupo ligado às cadeias alquila são: amino, amida, diol, ciano, sulfobetaína e ciclodextrina. Além disso, a ordem de eluição dos compostos em HILIC é oposta à ordem da fase reversa (Maldaner *et al.*, 2010).

As sílicas de fase quimicamente ligadas estão no grupo das resinas projetadas e são largamente utilizadas na cromatografia líquida moderna. Muitas dessas sílicas são denominadas de “reversa” em referência a sua superfície hidrofóbica.

A fase reversa normalmente é constituída de sílica ligada quimicamente a um grupo n-alquila de cadeia longa ou um polímero hidrofóbico. Há também a fase reversa composta apenas por polímeros orgânicos reticulados hidrofóbicos (copolímeros de estireno-divinilbenzeno reticulado) e carbono grafitado. Estas resinas diferem no grau de hidrofobicidade de acordo com a sequência: carbono grafitado > polímeros de ligação cruzada (poliestireno divinilbenzeno) > n-octadecil > n-octil (C8) > fenil > n-butil (C4) > cianopropil (CN) > diol (Schulte *et al.*, 2012).

Em cromatografia preparativa, a fase reversa é ideal para separar compostos polares. A separação baseia-se predominantemente na interação adsortiva das estruturas lipofílicas do soluto com os grupos funcionais apolares ligados na superfície da sílica. A ordem de eluição dos grupos funcionais do soluto é: aminas/álcoois/fenóis < ácidos < ésteres < éteres < aldeídos/cetonas < hidrocarbonetos aromáticos < hidrocarbonetos alifáticos (Unger e Weber, 1999).

2.4.3 Fase móvel para escala preparativa

A força motriz para a separação está relacionada ao equilíbrio termodinâmico e aos fenômenos de transferência de massa do soluto em relação ao sistema cromatográfico. A fase móvel influencia diretamente a separação através da solubilidade, e condicionamento da fase estacionária (Schulte *et al.*, 2012).

As principais características desejáveis da fase móvel são alta pureza, adequação ao detector cromatográfico, não degradação da fase estacionária ou do soluto, viscosidade baixa, ponto de ebulição adequado, e baixa toxicidade.

Em separação preparativa há menos opções de solventes do que para a analítica. Snyder e Kirkland (1979) examinaram o comportamento de 74 solventes, na qual apenas 27 foram considerados propícios. Os solventes mais usados são água, metanol e acetonitrila (Schulte *et al.*, 2012).

No quesito toxicidade o parâmetro ICH (do inglês *International Council for Harmonisation*) é utilizado para escolha dos solventes. O Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano é o único a reunir as autoridades reguladoras e a indústria farmacêutica para discutir aspectos científicos e técnicos (Schulte *et al.*, 2012). De acordo com a ICH os solventes da classe 1 devem ser evitados, os da classe 2 evitados se possível, e solvente classe 3, com baixo potencial tóxico, devem ser usados. Outro parâmetro utilizado é a Concentração Letal (CL 50).

2.4.4 Adsorventes e recursos usados na produção e quantificação do tacrolimo

Definir o sistema cromatográfico preparativo demanda tempo. Apesar de cada método possuir pré-tratamento específico e lidar com materiais de natureza diferente como por exemplo, caldo fermentado e sangue, é possível extrair informações importantes.

A mistura entre acetonitrila e água é recorrente em cromatografia líquida, inclusive para a quantificação do tacrolimo. Altas temperaturas definem o melhor pico cromatográfico em relação aos tautômeros. Outro fato relevante é a acidificação da fase móvel em alguns casos com ácido fosfórico ou ácido acético.

Na Tabela 2.5 são listadas as fases móveis com suas respectivas proporções e as temperaturas utilizadas para a quantificação do tacrolimo. Em todos os casos a coluna C18 foi utilizada.

Tabela 2.5 – Fase móvel usada para quantificar o tacrolimo em C18.

Fase móvel	Proporção volumétrica	T (°C)	Autor
Acetonitrila e água	30:20	50	Namiki <i>et al.</i> (1993)
Metanol e água	50:50	60	Wallemacq e Reding (1993)
Água, THF* e isopropanol	5:2:2	50	Namiki <i>et al.</i> (1995)
Acetonitrila e ácido fosfórico (1%)	60:40	50	Akashi <i>et al.</i> (1996)
Metanol e amônia (10 mm)	Gradiente	65	Bogusz <i>et al.</i> (2007)
Acetonitrila e água	Gradiente	50	Mo <i>et al.</i> (2009)
Acetonitrila e água	60:40	50	Singh e Behera (2009)
Acetonitrila e água	50:50	55	Jung <i>et al.</i> (2009)
Acetonitrila e água	60:40	60	Chen <i>et al.</i> (2012)
Ácido acético, acetonitrila e THF*	58:12:27	50	Ferraboschi <i>et al.</i> (2012)
Metanol e água	50:50	50	Mishra e Verma (2012)
Acetonitrila e água	75:25	60	Turło <i>et al.</i> (2012)
Acetonitrila e ácido fosfórico (1%)	65:35	60	Huang <i>et al.</i> (2013)
Acetonitrila e ácido fosfórico (1%)	68:32	50	Sun e Ye (2016)
Acetonitrila e ácido fosfórico (1%)	65:35	60	Wang <i>et al.</i> (2017)
Acetonitrila e água	60:40	60	Moreira <i>et al.</i> (2018)

THF*:Tetrahidrofurano

Outros adsorventes são citados na purificação do tacrolimo. Jung *et al.* (2011) utiliza coluna recheada com o adsorvente de Amberchrome CG161M™ com mistura de acetonitrila e água para separar o tacrolimo de coprodutos da fermentação de *Streptomyces*

sp. TST10, como os epímeros e a ascomicina. O adsorvente comercial utilizado pelos autores é o polímero poliestireno divinilbenzeno, normalmente indicado para a purificação de peptídeos. Segundo a DOW[®], o CG161M é uma alternativa a C18, ou seja, uma fase reversa. No mesmo trabalho, a resina DIAION[®] HP-20 é usada para a adsorção. O adsorvente também foi utilizado por Kino *et al.* (1987a) e se trata do mesmo polímero poliestireno divinilbenzeno. Ferraboschi *et al.* (2012) utilizaram sílica gel impregnada com nitrato de prata e o adsorvente comercial XAD. O adsorvente XAD não foi especificado por Ferraboschi *et al.* (2012). Sabe-se que a linha Amberlite[®] XAD são adsorventes baseados em polímeros como, por exemplo, estireno-divinilbenzeno e acrilatos.

Além das fases reversas, há trabalhos que citam outros recursos interessantes ao processo. Turlo *et al.* (2012) partiram do pressuposto de que compostos contendo anel de piridina poderiam ser precursores na biossíntese de tacrolimo. Os autores utilizaram ácido pipercolíco, ácido picolínico, L-lisina, ácido nicotínico e nicotinamida em diferentes meios e constataram aumento significativo na produção de tacrolimo. Outros autores também utilizaram diferentes pirimidinas, purinas e moléculas semelhantes, ou óleos vegetais ricos em tais compostos (Kim e Park 2007; Vaid, 2007; Jung *et al.*, 2009; Singh e Behera, 2009; Mishra e Verma, 2012; Xia *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2018).

Estas moléculas citadas para promover a produção podem ser recuperadas no processo de purificação e reintroduzidas na produção de tacrolimo. Christopherson *et al.* (2006) reportaram o uso das propriedades hidrofílicas e de troca iônica da sílica ligada ao grupo amino com fase móvel de acetonitrila e água para a identificação simultânea do ácido nicotínico e ácido picolínico. Olsen (2001) ainda demonstrou o poder de separação desta sílica para diferentes pirimidinas, purinas e moléculas semelhantes.

2.4.5 Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos são informações que auxiliam no estudo da separação. A banda eluída é utilizada para determinar tais parâmetros. Em baixas concentrações os picos apresentam comportamento gaussiano. A seguir, são apresentados alguns dos parâmetros cromatográficos e suas respectivas equações.

2.4.5.1 Fator de retenção e seletividade

A força de interação do soluto com a fase estacionária é proporcional ao tempo que cada composto permanece retido na coluna. O tempo de retenção corrigido (t'_R), Equação 2.1, é o tempo em que o soluto interage com o adsorvente (Collins *et al.*, 2006).

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2.1)$$

onde t_R é o tempo de retenção total e t_M é o tempo morto do sistema que é definido com o auxílio de um composto inerte no leito (Meyer, 2010).

O fator de retenção (k_i) é a relação entre a quantidade de soluto em cada fase ao longo da separação e é determinado de acordo com a Equação 2.2 (Meyer, 2010; Seidel-Morgenstern *et al.*, 2012):

$$k_i = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_M - t_{plan}} \quad (2.2)$$

em que t_{plan} é o tempo da planta, definido como o tempo em que o soluto leva para percolar a distância entre o injetor até o detector sem passar pela coluna.

A seletividade (α), Equação 2.3, fornece informações a respeito da separação do soluto mais retido, j , em relação ao menos retido, i (Seidel-Morgenstern *et al.*, 2012).

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i} \quad (2.3)$$

2.4.5.2 Altura equivalente e número de pratos

Um dos parâmetros-chave para a caracterização do sistema cromatográfico é a eficiência da coluna em termos da altura equivalente de prato teórico (*HETP*, do inglês *height of an equivalent theoretical plate*). O *HETP* pode ser determinado pela Equação 2.4 (Ruthven, 1984).

$$HETP = \frac{L}{N} = \left(\frac{\sigma}{t'_R} \right)^2 L \quad (2.4)$$

onde L é o comprimento do leito, σ^2 é o segundo momento. A eficiência da separação é determinada a partir do número de pratos (N). Um prato teórico equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre o adsorvente e a fase móvel. O valor de N pode ser determinado por meio da Equação 2.5 (Seidel-Morgenstern *et al.*, 2012).

$$N = 5,545 \left(\frac{t'_R}{w_h} \right)^2 \quad (2.5)$$

em que w_h é a largura do pico à meia altura. Quanto maior o número de pratos maior é a eficiência da coluna e, conseqüentemente, melhor a separação.

2.4.5.3 Resolução

A resolução (R_s) avalia a qualidade da separação através do número de pratos, do fator de retenção e da seletividade (Equação 2.6) (Seidel-Morgenstern *et al.*, 2012).

$$R_s = \frac{\sqrt{N_i}}{4} \left(\frac{k_i}{k_i + 1} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) = 1,177 \frac{(t'_{Ri} - t'_{Rj})}{w_{hi} + w_{hj}} \quad (2.6)$$

Valores de resoluções iguais a 1 indicam que os picos estão separados com 3% de superposição das bandas. Quando $R_s = 1,25$ há separação suficiente para fins quantitativos e $R_s > 1,50$ indica separação completa (Collins *et al.*, 2006; Seidel-Morgenstern *et al.*, 2012).

2.4.5.4 Porosidades

A porosidade total (ε_T) está relacionada com a fração de vazios (ε) e da porosidade da partícula (ε_p) segundo a Equação 2.7 (Seidel-Morgenstern *et al.*, 2012).

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (2.7)$$

Experimentalmente a porosidade total e a porosidade do leito são determinadas utilizando um composto inerte através da equação do primeiro momento (Equação 2.8) (Seidel-Morgenstern *et al.*, 2012).

$$t'_R = \frac{L}{u} \varepsilon \quad (2.8)$$

em que u é a velocidade superficial da fase estacionária e L é o comprimento específico do leito.

A Tabela 2.6 apresenta os principais inertes empregados para a determinação das porosidades em colunas de fase normal e de fase reversa.

Tabela 2.6 – Compostos inertes para a determinação experimental das porosidades.

Composto inerte	Fase	Parâmetro
Azul de dextrana	Normal	Fração de vazios
Poliestireno	Reversa	Fração de vazios
1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB)	Normal	Porosidade total
Uracila	Reversa	Porosidade total

2.4.5.5 Influência da temperatura

O estudo das energias envolvidas na adsorção pode ser realizado de acordo com a abordagem de Van't Hoff. A Equação 2.9 é utilizada para determinar a variação de entalpia de adsorção (ΔH) e entropia (ΔS). A entalpia é utilizada tanto para caracterizar o tipo de adsorção quanto para avaliar se o fenômeno é endotérmico ou exotérmico.

$$\ln k_i = -\frac{1}{T} \frac{\Delta H_i}{R} + \frac{\Delta S_i}{R} + \ln \frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \quad (2.9)$$

em que k_i é o fator de retenção, T é a temperatura, R é a constante dos gases e ε_T é a porosidade total (Ruthven, 1984; Lämmerhofer, 2010; Ferrari, 2014).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O TACROLIMO

Na revisão bibliográfica foram apresentados o contexto nacional em que o tacrolimo está inserido e os principais avanços do ponto de vista técnico de produção e recuperação do fármaco. No que diz respeito ao contexto nacional foram explorados dados econômicos de saúde pública no Brasil e o impacto do custo do tacrolimo para o Ministério da Saúde. Além disso, demonstrou-se o aumento da demanda do tacrolimo e a ausência de um sistema produtivo sólido que garanta o fornecimento do medicamento, que é de uso crônico, ao SUS.

Como já mencionado na introdução desta Tese, houve um esforço da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), vinculada ao Ministério da Saúde, a mais destacada instituição de ciência e tecnologia em saúde da América Latina, para a produção do tacrolimo junto à Libbs. No entanto, a obtenção de fármaco altamente puro é um desafio, visto que além das adversidades convencionais de bioprocessamento, ainda é necessário isolar o tacrolimo de moléculas estruturalmente semelhantes a ele produzidas na fermentação como, por exemplo, a ascomicina. Outro inconveniente técnico é a reação de epimerização promovida pela água ao longo do processo de purificação que converte o tacrolimo nos epímeros diol e C-10.

Na literatura são apresentados processos capazes de isolar o tacrolimo. Entretanto há questões técnicas ainda a serem resolvidas como, por exemplo, as que são apresentadas em seguida:

2.5.1 Kino *et al.* (1987a)

O trabalho foi pioneiro e bem detalhado, no entanto o procedimento para a purificação e recuperação do tacrolimo está defasado do ponto de vista de processo como, por exemplo, o uso excessivo de etapas de cristalização e purificações cromatográficas.

2.5.2 Okuhara *et al.* (1990)

Na patente de Okuhara *et al.* (1990) faltam especificações técnicas sobre colunas empregadas, e não são citadas ou apresentadas informações com relação a pureza do tacrolimo obtido ao final do processo.

2.5.3 Nishihara *et al.* (2002)

O tacrolimo produzido no processo de Nishihara *et al.* (2002) não é adequado para finalidades farmacêuticas devido à pureza ser inferior a 98%.

2.5.4 Higaki *et al.* (2003)

Os autores empregam nitrato de prata para a purificação do tacrolimo. O nitrato de prata poder invalidar o processo de ampliação de escala do ponto de vista técnico-econômico, devido ao alto custo da molécula. Além disso, não foi apresentada a pureza final do tacrolimo.

2.5.5 Keri *et al.* (2005)

O processo é complexo para ser montado e operado. São necessários pelo menos 3 sistemas cromatográficos que utilizam diversos solventes. Outro ponto importante é que ao longo das separações cromatográficas nem todas as bateladas podem ser utilizadas, pois nem sempre a pureza adequada é atingida.

2.5.6 Kumar *et al.* (2007)

Kumar *et al.* (2007) sugerem um processo de purificação generalista e com informações insuficiente. Além disso, não foram identificadas operações unitárias adequadas para a separação dos epímeros, nem informada a pureza do tacrolimo obtido.

2.5.7 Buchta *et al.* (2008)

No processo de Buchta *et al.* (2008) não há uma etapa de pré-purificação. Neste caso o tempo de vida útil das colunas cromatográficas é drasticamente reduzido. Os autores utilizam solventes não adequados para a produção de fármacos como, por exemplo, o

tolueno. O uso abusivo do tolueno desencadeia disfunção cerebral e atrofia do hipocampo. Além disso, anomalias neuropatológicas são observadas em indivíduos expostos a altos níveis do solvente (Kodavanti *et al.*, 2015).

2.5.8 Cabri *et al.* (2008)

O processo é de difícil execução, complexo e trabalhoso. Na segunda etapa cromatográfica é obrigatório o uso de nitrato de prata. Além disso, nem todas as bateladas cromatográficas atendem a especificação de pureza requerida para o tacrolimo.

2.5.9 Cvak *et al.* (2008)

Os autores imobilizaram o nitrato de prata em adsorventes de fase normal, no entanto admitem que o nitrato de prata possa desprender do leito e contaminar o tacrolimo. A pureza obtida por Cvak *et al.* (2008) foi insuficiente para fins farmacêuticos.

2.5.10 Patil *et al.* (2009)

Na etapa de pré-purificação o caldo fermentado foi tratado com gás amoníaco, no entanto Patil *et al.* (2009) não relatam os ganhos deste procedimento. No processo também é obrigatoriamente empregado nitrato de prata em uma das etapas cromatográficas.

2.5.11 Choi *et al.* (2013)

No processo é necessário controlar o valor do pH em diversas etapas de pré-purificação e purificação, inclusive nas separações cromatográficas. O estresse químico causado por pH extremo, como o deste processo, reduz drasticamente o tempo de vida útil do leito. Outro inconveniente é o uso de solventes inadequados para indústria farmacêutica ou de alto custo como, por exemplo, clorofórmio, tetraclorometano, diclorometano, cloreto de metileno e cloreto de metileno. Os autores também fazem uso do nitrato de prata, que pode inviabilizar a ampliação de escala do ponto de vista técnico-econômico.

CAPÍTULO 3

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho trata da segunda Tese de Doutorado na linha de pesquisa sobre processamento do tacrolimo, conduzida no Laboratório de Processo de Transferência de Massa (LPTM) do programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Departamento de Engenharia de Processos (DEPro) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os experimentos foram conduzidos no LPTM e no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renováveis (LEBBPOR) do Departamento de Engenharia de Processos (DEPro). O processo fermentativo seguiu até a etapa de inoculação do microrganismo no LEBBPOR. Em seguida, a fermentação e o processo de purificação foram realizados no LPTM.

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados direta e indiretamente em todo o processo de obtenção e purificação do composto-alvo, o tacrolimo.

3.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

3.1.1 Cepa de bactérias *Streptomyces tsukubaensis* e padrão de tacrolimo

A cepa da bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, utilizada para obter o tacrolimo, foi adquirida pelo Laboratório de Processos de Transferência de Massa (LPTM) junto ao Instituto Leibniz DSMZ – Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares, onde se encontra armazenada sob a sigla DSM 42081. A cepa foi encaminhada à Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, sob o código CBMAI – 1832. O microrganismo se trata da mesma cepa proveniente da bactéria utilizada por Kino *et al.* (1987a).

O padrão do tacrolimo foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Paulo César Pires Rosa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP. O fármaco foi originalmente adquirido junto a Sigma-Aldrich (CAS 109581-93-3, pureza $\geq 98\%$).

3.1.2 Cultivo em placa, pré-inoculação, inoculação e fermentação

3.1.2.1 Equipamento

As etapas de pré-inoculação, inoculação e fermentação preliminar foram realizadas no LEBBPOR em incubadora do tipo *shaker* orbital (Shel Lab, EUA) e com auxílio de capela de fluxo laminar horizontal (Velco, Brasil). O pH foi quantificado pelo potenciômetro KAVIS modelo K39-2014B (China).

Para a fermentação foi montado o aparato mostrado na Figura 3.1 no LPTM. Em sua construção utilizou-se agitador magnético Fisatom modelo 753 (Brasil), banho recirculante Thermo Scientific Phoneix II C25P (sensibilidade de $\pm 0,05\text{ }^{\circ}\text{C.}$) (EUA), frasco Schott de 2 L (136×265 mm), tubo de nylon, barra magnética, mangueira de silicone e hastes de madeira. O equipamento foi previamente testado com água e se mostrou capaz de manter a temperatura e a agitação constantes.

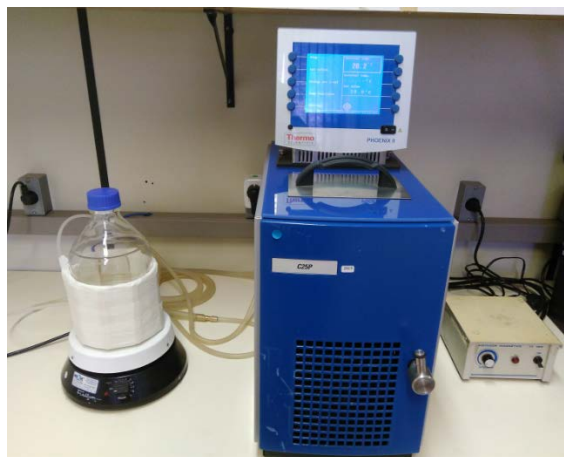


Figura 3.1 – Aparato utilizado na fermentação.

3.1.2.2 Meios de cultivo

Os reagentes utilizados no cultivo em placa, pré-inóculo e inóculo estão listados na Tabela 3.1. Os produtos utilizados eram reagentes para análise (PA, do inglês *Pro analyze*).

Tabela 3.1 – Materiais utilizados para placa de Petri, pré-inoculação e inoculação.

Compostos	CAS/REF	Aplicação	Fornecedor	País
Ácido clorídrico	7647-01-0	Ajuste de pH	Synth [®]	Brasil
Agar	K25-611001*	Placa de Petri	KASVI	Itália
D(+) Maltose	6363-53-7	Inóculo	Dinâmica [®]	Brasil
Glicose	492-62-6	Inóculo	Dinâmica [®]	Brasil
Extrato de levedura	K25-611005*	Inóculo	KASVI	Itália
Extrato de malte	K25-611006*	Inóculo	KASVI	Itália
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Ajuste de pH	Dinâmica [®]	Brasil

*referência do fornecedor.

Na fermentação foram empregados os reagentes mostrados na Tabela 3.2. Todos os reagentes, exceto o óleo de castanha-do-brasil, eram de grau PA.

Tabela 3.2 – Relação de compostos utilizados para a fermentação.

Compostos	CAS/REF	Fornecedor	País
Ácido picolínico	98-98-6	Sigma-Aldrich	EUA
Carbonato de cálcio	471-34-1	Dinâmica [®]	Brasil
D(+) Maltose	6363-53-7	Dinâmica [®]	Brasil
Fosfato de potássio dibásico	7758-11-4	Dinâmica [®]	Brasil
Fosfato de potássio monobásico	7778-77-0	Dinâmica [®]	Brasil
Glicose	492-62-6	Dinâmica [®]	Brasil
Licor íngreme de milho	66071-94-1	Sigma-Aldrich [®]	EUA
Óleo de castanha-do-brasil	-	Amazon Oil Industry	Brasil
Peptona de soja	K25-612501*	KASVI	Itália
Sulfato de magnésio heptahidratado	10034-99-8	Dinâmica [®]	Brasil

*referência do fornecedor .

3.1.3 Cromatógrafo e sistema de aquecimento

Na purificação e quantificação do tacrolimo, realizado no LPTM, utilizou-se o HPLC Shimadzu (Japão) constituído por bomba (LC-20AT), detector UV-Vis (SPD-20A) e placa controladora (CBM-20A). O controle de temperatura do sistema foi realizado com o banho termostático Quimis (modelo Q-2142M, Brasil), erro de $\pm 0,1$ °C. Água destilada foi usada como fluído refrigerante.

Para manter a temperatura da coluna cromatográfica, construiu-se o trocador de calor. A tubulação da fase móvel passa pelo interior do tubo de acrílico, que foi ligado ao banho termostático por mangueiras de silicone como pode ser observado ao lado direito da Figura 3.2. Tubos isolantes (Polipex) foram usados ao longo da tubulação da fase móvel.



Figura 3.2 – Trocador de calor para o sistema cromatográfico.

O controle de temperatura da coluna cromatográfica foi realizado por um aparato confeccionado com tubos, placas e cap de policloreto de vinila (PVC) que também foi ligado ao banho termostático e pode ser identificado do lado da Figura 3.2. Para vedação foi utilizada cola para PVC e anéis O'ring. Na parte interna dos caps foram coladas placas de PVC, como mostrado no corte da Figura 3.3. As placas foram moldadas por fresa na forma sextavada dos encaixes finais das colunas.

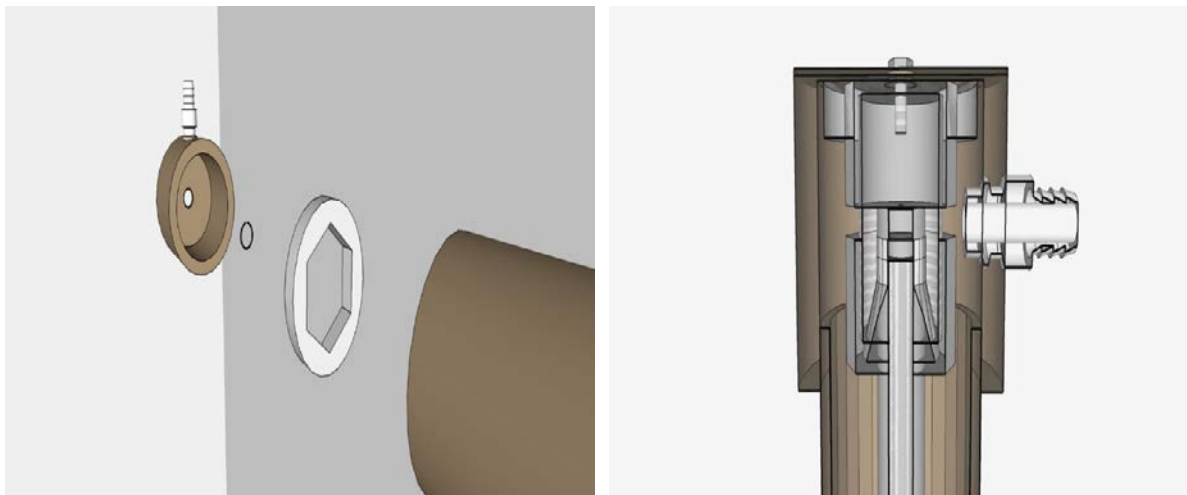


Figura 3.3 – Representação dos componentes do trocador de calor.

Para favorecer o encaixe da placa e do o anel O'ring, os lados interno e externo dos caps foram aplainados. Além disso, foram desenhados sulcos no casco para facilitar o encaixe dos anéis O'ring A entrada e a saída do fluído refrigerante da coluna foi construída com espigões com rosca.

3.1.4 Evaporador

O sistema de evaporação sob vácuo foi utilizado para o método de quantificação e ao longo da purificação do tacrolimo. A evaporação foi conduzida no evaporador rotativo Fisatom, modelo 803. O aquecimento foi desempenhado utilizando água destilada no banho de aquecimento Fisatom, modelo 558. A condensação foi realizada com o auxílio do banho termostático Neslab Endocal RTE-110 (EUA).

3.1.5 Colunas, adsorventes e meios filtrantes

A purificação foi conduzida no LPTM com os adsorventes citados na Tabela 3.3. Os adsorventes foram empacotados pelo método a seco em colunas de aço inoxidável 316. Duas dimensões diferentes de coluna foram utilizadas para os experimentos: 250×10 mm e 100×10 mm.

Ao longo da pré-purificação, purificação e quantificação do tacrolimo também foram utilizados os meios filtrantes descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.3 – Adsorventes usados na etapa de pré-purificação e purificação.

Compostos	CAS/REF	Diâmetro médio	Fornecedor	País
Carvão ativado LA	7440-44-0	45 µm	Alphacarbo	Brasil
DIAION[®] HP-20	9052-95-3	250-850 µm	Supelco [®]	EUA
PEDVB^{**}	9003-70-7	6-10 µm	Sigma-Aldrich [®]	EUA
Sílica C18	5149682 [*]	20 µm	Grace Vydac [®]	Reino Unido
Sílica Luna NH₂	00A-4377-B0 [*]	10 µm	Phenomenex [®]	EUA

*referência do fornecedor

**poli (estireno-co-divinilbenzeno)

Tabela 3.4 – Meios filtrantes usados na purificação.

Materiais	Ref. do fornecedor	Abertura do poro	Fornecedor	País
Membrana da seringa	729205	0,45 µm	CHROMAFIL [®]	Alemanha
Membrana	FHLC04700	0,45 µm	Millipore TM	Brasil
Papel filtro	106	3,0 µm	INLAB	Brasil

3.1.6 Padrões utilizados na determinação da porosidade e fração de vazios

Na determinação de porosidades e fração de vazios dos leitos empacotados nas colunas cromatográficas usaram-se os reagentes da Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Inertes utilizados na determinação da porosidade.

Compostos	CAS	Quantificação	Fornecedor	País
TTBB*	1460-02-2	Porosidade total	Sigma-Aldrich [®]	EUA
Azul de dextrana	87915-38-6	Fração de vazios	Sigma-Aldrich [®]	EUA
Uracila	66-22-8	Porosidade total	Sigma-Aldrich [®]	EUA

*1,3,5-tri-terc-butilbenzeno

3.1.7 Solventes empregados na purificação e quantificação do tacrolimo

Na quantificação do tacrolimo, pré-purificação e purificação utilizou-se os solventes citados na Tabela 3.6 e água deionizada ultrapura.

Tabela 3.6 – Solventes empregados na extração e como fase móvel.

Compostos	CAS	Pureza	Fornecedor	País
Acetato de etila	141-78-6	HPLC	Tedia®	Espanha
Acetona	67-64-1	PA	Dinâmica®	Brasil
Acetonitrila	75-05-8	HPLC	Scharlab	Espanha
Ácido Acético	64-19-7	HPLC	Panreac	Brasil
Etanol	64-17-5	HPLC	Tedia®	EUA
Hexano	110-54-3	HPLC	Scharlab	Espanha
Isopropanol	67-63-0	HPLC	Scharlab	Espanha
Metanol	CAS 67-56-1	HPLC	Tedia®	Espanha
Tetrahidrofurano	109-99-9	HPLC	Tedia®	Espanha

3.1.8 Quantificação de açúcares redutores e proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). O experimento foi conduzido utilizando os reagentes listados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Reagentes usados na quantificação de proteínas totais.

Compostos	CAS/REF	Fornecedor	País
Albumina bovina sérica	9048-46-8	Sigma-Aldrich®	EUA
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Dinâmica®	Brasil
Reagente de Bradford	B6916*	Sigma-Aldrich®	EUA

*referência do fornecedor

Na quantificação de açúcares redutores usou-se o método colorimétrico modificado de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson, 1960). A Tabela 3.8 apresenta os reagentes utilizados.

Em ambos os métodos colorimétricos se utilizou a centrífuga Hettich, modelo Rotina 420R (Alemanha), e o espectrofotômetro V-Vis Geneys-10 UV (EUA).

Tabela 3.8 – Reagentes usados na quantificação açúcares redutores.

Compostos	CAS	Fornecedor	País
Ácido sulfúrico	7664-93-9	ECIBRA [®]	Brasil
Arseniato de sódio	10048-95-0	Sigma-Aldrich [®]	EUA
Bicarbonato de sódio	144-55-8	Dinâmica [®]	Brasil
Dextrose anidra	492-62-6	Dinâmica [®]	Brasil
Molibdato de amônio	12054-85-2	Dinâmica [®]	Brasil
Sulfato de cobre 5H₂O	7758-99-8	Synth [®]	Brasil
Tartarato de sódio e potássio	6381-59-5	Dinâmica [®]	Brasil
Carbonato de sódio	497-19-8	Dinâmica [®]	Brasil

3.2 MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE TACROLIMO

Para o estudo da purificação do tacrolimo foi necessário gerar caldo fermentado a partir de *Streptomyces tsukubaensis*. Os meios utilizados para a fermentação descritos neste tópico foram preparados a fim de gerar caldo fermentado com diferentes tipos de complexidade no contexto da purificação e recuperação do tacrolimo.

3.2.1 Placa de Petri e tubos criogênicos

O procedimento para o crescimento e o armazenamento da bactéria foi realizado o meio de cultivo GYM *Streptomyces* MEDIUM de acordo com a recomendação da fornecedora da cepa (DSMZ Microorganisms, 2017). O meio para o cultivo em placa de Petri foi preparado adicionando-se glicose, extrato de levedura, extrato de malte, carbonato

de cálcio em água destilada. Ajustou-se o pH com soluções de NaOH e KCL. Por fim, foi adicionado meio sob agitação.

3.2.2 Pré-inoculação e inoculação

O pré-inóculo e o inóculo foram baseados no trabalho de Turlo *et al.* (2012), Tabela 3.9. A maltose e a glicose foram esterilizadas em autoclave separadamente dos extratos de malte e levedura e, posteriormente, misturadas.

Tabela 3.9 – Meio de pré-inoculação e inoculação (Turlo *et al.*, 2012).

Composto	Proporção massa/voluma (g/mL)
Extrato de malte	0,6
Glicose	0,6
Maltose	0,6
Extrato de levedura	0,12

Para a pré-inoculação, vertia-se o meio preparado de acordo com a Tabela 3.9 em cada um dos 3 *erlenmeyers*, que foram incubados em estufa tipo *shaker* sob agitação (Allan, 2001; Turlo *et al.*, 2012). Em 2 *erlenmeyers* eram adicionados uma parte do meio e outra de pré-inóculo. Um terceiro *erlenmeyer* era utilizado como controle apenas com o meio. Aguardou-se o crescimento do microrganismo que atingiu a densidade ótica adequada em aproximadamente 24 horas. Os inóculos não usados na fermentação foram destinados para a confecção de novas placas de Petri e criotubos.

3.2.3 Fermentação

Três diferentes meios foram preparados, de acordo com a Tabela 3.10, para produzir o caldo fermentado rico em tacrolimo. Os trabalhos utilizados como referência da fermentação foram Turlo *et al.* (2012), Singh e Behera (2009), Mishra e Verma (2012), Moreira (2018). O meio de fermentação foi preparado em frasco Schott, com pH ajustado e esterilizado em autoclave. Devido à instabilidade do bastão magnético (8×50 mm) no meio fermentativo, o procedimento foi conduzido com a menor agitação disponível no agitador

magnético. A fermentação foi interrompida em 96 horas com base no estudo preliminar de fermentação conduzido em *erlenmeyer*.

Tabela 3.10 – Meios utilizados para fermentação.

Compostos	Relação massa/volume (g/mL)		
	Maltose (3%)	Glicose (3%)	OCB (3%)
Fonte de Carbono	Maltose (3%)	Glicose (3%)	OCB (3%)
Ácido picolínico	0,0025%	-	-
Peptona de soja	3%	3%	3%
Licor de milho	1%	1%	1%
MgSO ₄	0,05%	0,05%	0,05%
KH ₂ PO ₄	0,2%	0,2%	0,2%
K ₂ HPO ₄	0,4%	0,4%	0,4%
CaCO ₃	0,3%	0,3%	0,3%

OCB*: Óleo de castanha-do-brasil

3.3 ESTRATÉGIA PARA A PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO

O processo de purificação proposto nesta Tese foi baseado em Kino *et al.* (1987a) e nas patentes citadas no tópico “Recuperação e purificação do tacrolimo”. Ao se traçar a rota de purificação o processo foi dividido em pré-purificação e purificação.

3.3.1 Pré-purificação

Na pré-purificação buscou-se retirar as impurezas grosseiras do meio de fermentação, concentrar o caldo fermentado a um volume compatível com o sistema cromatográfico e retirar o excesso de materiais coloridos, proteínas, lipídeos e açúcares. Para tanto, foi empregado operações como filtração e extração.

A pré-purificação foi iniciada após a fermentação, em que se adicionou acetona no caldo fermentado. A solução obtida foi filtrada com papel filtro INLAB tipo 10 depois evaporada até se obter um óleo viscoso e escuro, que foi extraído com a utilização de solventes apropriados. Ao promover a mistura do solvente usado para a extração com o

óleo observou-se a formação de uma mistura heterogênea de duas ou três fases. Em seguida, estudou-se a possibilidade de purificação da fase rica em tacrolimo utilizando o carvão ativado e DIAION[®] HP-20. Os resultados não atenderam os requisitos da purificação, no entanto tal estudo promoveu a possibilidade de utilizar o adsorvente DIAION[®] HP-20 como uma matriz para extrair o tacrolimo. Neste caso, DIAION[®] HP-20 foi adicionada junto à fase leve e toda a solução foi evaporada em um evaporador rotativo. O material antes solubilizado na fase leve aderiu-se sobre a superfície do adsorvente. Para extrair o tacrolimo do adsorvente testaram-se diferentes solventes orgânicos. A extração foi conduzida em temperatura ambiente. Ao final da pré-purificação, o solvente usado na extração foi evaporado sob vácuo e o tacrolimo foi solubilizado em acetonitrila.

3.3.2 Etapa de purificação

Na purificação foram testados vários sistemas cromatográficos para a purificação do material obtido na etapa de pré-purificação. A coluna cromatográfica e a fase móvel foram definidas segundo a seletividade (Equações 2.3) e a resolução (Equações 2.6). Calcularam-se tais parâmetros com o caldo fermentado pré-purificado sob a hipótese de mistura pseudobinária, em que as impurezas da amostra eram representadas pelo pico mais expressivo do cromatograma em relação ao pico do tacrolimo.

O empacotamento a seco consistiu em adicionar o material particulado dentro da coluna, compactar o leito por vibração e repetir o processo até a coluna ser totalmente preenchida. Os adsorventes usados foram octadecilsilano (C18), poli (estireno-co-divinilbenzeno) (PEDVB), grupo amino (NH₂) ligado à sílica e carvão ativado.

A conformidade do leito foi avaliada pelo perfil de eluição. A determinação das porosidades e frações de vazios das colunas pode ser encontrada nos Apêndices A e B.

Os solventes candidatos à fase móvel foram isopropanol, etanol, metanol, acetonitrila, acetato de etila, hexano, ácido acético e água. O comprimento de onda do detector foi determinado por varredura no cromatógrafo. Utilizou-se os comprimentos 210 nm para fase móvel com acetonitrila, água e álcoois, e 260 nm para misturas com acetato de etila ou hexano.

3.3.3 Cristalização do tacrolimo

No procedimento de cristalização, a solução contendo acetonitrila e água foi misturada com o acetato de etila. As duas fases formadas foram separadas. A mistura composta por acetato de etila e acetonitrila foi evaporada em rota evaporador. Os cristais obtidos foram lavados com água deionizada e secos à temperatura ambiente.

3.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

Ao longo da fermentação, pré-purificação e purificação foi utilizado cromatografia líquida para avaliar a redução da área cromatográfica das impurezas e a concentração do tacrolimo. Utilizaram-se também métodos colorimétricos para a quantificação de proteínas totais e açúcares redutores. Na fermentação, obteve-se a biomassa de células seca para a determinação da produção específica de cada fermentação. A seguir são apresentados os métodos utilizados.

3.4.1 Quantificação da biomassa

Para quantificar a biomassa produzida na fermentação coletou-se 5 mL do meio fermentado e adicionou-se 5 mL de acetona. Após 12 horas de repouso as amostras foram filtradas com papel filtro INLAB tipo 10. O material retido foi lavado com acetona.

Os papéis filtros empregados na filtração foram previamente identificados e secos em estufa a 70 °C por 24 horas, antes e após a filtração. Definiu-se como biomassa, a massa total de células seca (DCW, do inglês *Dry Cell Weight*), que foi determinada pela diferença da massa antes e depois da filtração.

3.4.2 Quantificação de tacrolimo

A quantificação do tacrolimo foi realizada em duas etapas. Na primeira, as amostras coletadas na fermentação foram preparadas para a quantificação no HPLC. As amostras da pré-purificação e purificação não exigiram a primeira etapa. No entanto, em determinadas situações a amostra teve de ser diluída em fase móvel para atender o espectro de concentração da curva de calibração, e, posteriormente, a concentração final da amostra foi corrigida pelo fator de diluição. A segunda etapa foi a quantificação no HPLC. Mais

informações sobre o método de quantificação do tacrolimo podem ser encontradas no Apêndice C.

3.4.2.1 Preparo da amostra

No preparo da amostra proveniente do caldo fermentado retirou-se uma alíquota de 5 mL e adicionou-se 5 mL de acetona. Após 24 horas a amostra foi filtrada (INLAB Tipo 10, porosidade 3,0 μm). O filtrado foi evaporado sob vácuo (700 mmHg e 60 °C) até gerar um material viscoso e escuro. Tal material foi solubilizado em 5 mL de fase móvel (70% de acetonitrila e 30% de água) formando uma mistura bifásica ou trifásica.

3.4.2.2 Quantificação em HPLC

Na segunda etapa, o sobrenadante foi quantificado em HPLC. A quantificação do tacrolimo foi realizada na coluna Phenomenex Luna[®] C18, diâmetro de partícula de 5 μm , abertura de poro de 100 Å e 250 \times 4,6 mm de dimensão (Referência do fornecedor: 00G-4041-E0).

A fase móvel foi constituída de acetonitrila e água na proporção volumétrica 70/30. As condições operacionais foram temperatura de 60°C e 1 mL/min, comprimento de onda de 210 nm e *loop* de 20 μL . A concentração do sobrenadante proveniente da fermentação, obtida pela curva de calibração, foi convertida na concentração do caldo fermentado de acordo com a Equação 3.1.

$$C_{Tac} = \frac{C_{SN} V_{SN}}{V_{AM}} \quad (3.1)$$

em que C_{Tac} é a concentração do tacrolimo no caldo fermentado (mg/L), C_{SN} a concentração de tacrolimo no sobrenadante (mg/L), V_{SN} é o volume do sobrenadante (mL) e V_{AM} é o volume da amostra retirada do caldo fermentado (mL).

3.4.2.3 Curva de calibração do tacrolimo

O soluto utilizado como padrão foi o tacrolimo (pureza $\geq 98\%$). A Figura 3.4 apresenta os dados obtidos pelas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L.

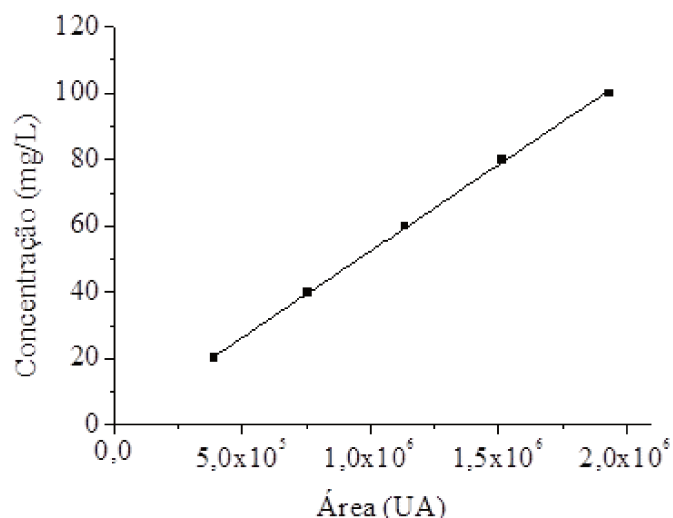


Figura 3.4 – Curva de calibração do tacrolimo.

A regressão linear da Figura 3.4 forneceu a Equação 3.2 e o coeficiente de determinação de 0,99926.

$$y = 5,202 \cdot 10^{-5} x + 0,327 \quad (3.2)$$

O procedimento foi realizado de acordo com a instrução normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicado no Diário Oficial da União em 22/07/2009 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009).

3.4.3 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O método fundamenta-se na adição de etanol, ácido fosfórico e corante brilhante azul Coomassie G-250 à amostra. No pH de reação, a interação entre a proteína e o corante favorece o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul) (Bradford, 1976).

3.4.3.1 Procedimento de quantificação das proteínas totais

A quantificação foi conduzida em duplicata e aplicada a diferentes etapas da pré-purificação. Apesar ser rápido e sensível, o método de Bradford está sujeito à interferência de solventes, como por exemplo, a acetonitrila. *Zaia et al.* (1998) sugerem diversas estratégias para uniformizar a absorvidade específica de diferentes proteínas, dentre elas a utilização de meio básico para a análise.

No preparo das amostras foram selecionados 100 μL do material a ser quantificado. Quando necessário utilizou-se fator de diluição para respeitar o limite da curva de calibração. Na amostra foi adicionado 100 μL de NaOH (1N) e 2,5 mL de reagente de Bradford. As misturas foram agitadas em vórtex, e aguardou-se 20 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram lidas em 595 nm no espectrofotômetro (*Pozzobon et al.*, 2014).

3.4.3.2 Curva de Calibração

Na determinação da curva de calibração (Figura 3.5) utilizou-se albumina bovina sérica (pureza $\geq 98\%$) como padrão. As concentrações utilizadas foram 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/L.

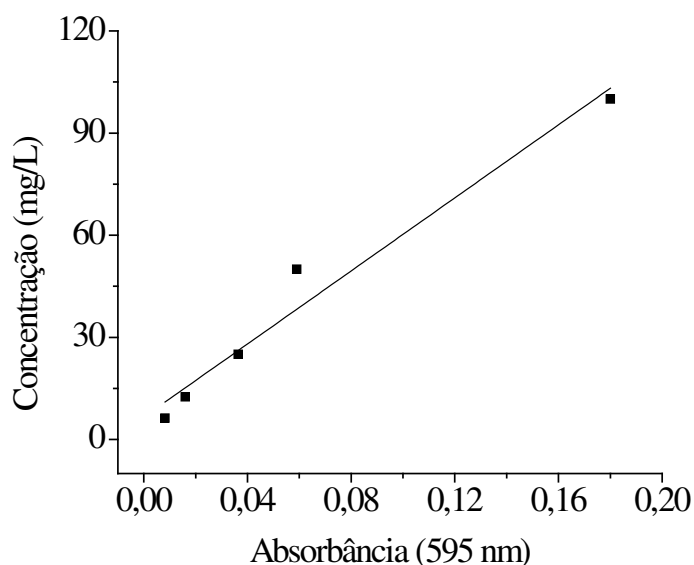


Figura 3.5 – Curvas de calibração para determinação de proteínas totais.

Cada concentração foi preparada conforme o procedimento de quantificação das proteínas totais. Obteve-se, pela regressão linear, o coeficiente de determinação de 0,959 e Equação 3.3.

$$y = 536,486x + 6,593 \quad (3.3)$$

3.4.4 Quantificação de açúcares redutores

Os monossacarídeos são açúcares redutores caracterizados por apresentarem grupos carbonílicos ou cetônicos livres, que são capazes de serem oxidados na presença de agentes alcalinos. A quantificação dos açúcares redutores foi realizada através do método modificado de Somogyi-Nelson, que utiliza tal reação. O princípio do método se fundamenta na redução de Cu^{++} (íon cúprico) em Cu^+ (íon cuproso) através do açúcar redutor, formando assim, o óxido cuproso (Cu_2O). Por sua vez, o Cu_2O reduz arsenomolibdato para produzir óxido de molibdênio, composto de coloração azul, utilizado para quantificar os açúcares redutores (Somogyi, 1952; Nelson, 1960). O método original foi modificado a partir de alterações de vários métodos, inclusive o colorimétrico, em que o cobre é reduzido formando compostos coloridos que podem ser quantificados por espectrofotometria (Maldonade *et al*, 2013).

3.4.4.1 Preparo dos reagentes

O reagente de Somogyi-Nelson I (SN-I) e o reagente de Somogyi-Nelson II (SN-II) foram preparados de acordo com Maldonade *et al.* (2013). No preparo do SN-I, os reagentes citados na Tabela 3.11 foram pesados e solubilizados na ordem descrita em 1 litro de água. Após 24 horas no escuro, o reagente foi filtrado e condicionado em frasco âmbar recoberto por folha de alumínio. No preparo do reagente SN-II dissolveu-se 50 g de molibdato de amônio anidro em 900 mL de água deionizada. Lentamente e sob agitação, adicionou-se 42 mL de ácido sulfúrico concentrado, e, em seguida, mais 50 g de arseniato de sódio solubilizado previamente em 50 mL de água deionizada. A solução SN-II foi incubada por 24 horas a 37 °C e armazenada em frasco âmbar recoberto por folha de alumínio.

Tabela 3.11 – Preparo do reagente de Somogyi-Nelson I.

Reagentes	Massa (g)
Sulfato de cobre pentahidratado	6,25
Carbonato de sódio anidro	24
Bicarbonato de sódio	16
Tartarato de sódio e potássio	12
Sulfato de sódio anidro	18

3.4.4.2 Procedimento de quantificação dos açúcares redutores

No procedimento de quantificação, realizado em duplicata, pipetou-se 0,5 mL da amostra a ser quantificada em tubo de ensaio. Adicionou-se 2 mL do reagente SN-I. A amostra foi agitada e aquecida em banho-maria a 100 °C por 6 minutos. Em seguida, resfriou-se a amostra por 5 minutos em banho com gelo. O reagente SN-II (2 mL) foi adicionado à amostra. Agitou-se novamente a amostra e aguardou-se 5 minutos. Decorrido o tempo, adicionou-se 25 mL de água destilada. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 540 nm.

3.4.4.3 Curva de calibração

A determinação da curva de calibração foi realizada utilizando glicose como padrão. As concentrações usadas para a curva de calibração foram 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L. As amostras de cada concentração foram submetidas ao procedimento descrito em “Procedimento de quantificação de açúcares redutores”. A absorbância foi quantificada em 540 nm. A curva de calibração determinada é apresentada pela Figura 3.6.

Aplicando regressão linear simples nos dados obteve-se a Equação 3.4 e o coeficiente de determinação no valor de 0,999.

$$y = 689,026x - 5,162 \quad (3.4)$$

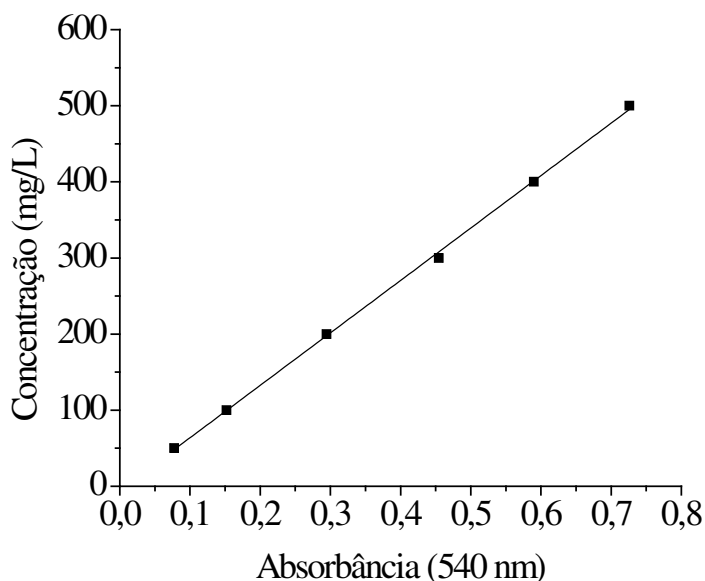


Figura 3.6 – Curvas de calibração para determinação de açúcares redutores.

3.5 ANÁLISE DE CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Os cristais obtidos pelo processo de purificação do tacrolimo foram analisados pelo Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

A análise de DSC (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) foi conduzida no calorímetro diferencial de varredura Shimadzu modelo DSC-50. A curva de DSC foi determinada com taxa de aquecimento de 20 °C/min entre as temperaturas de 25-300 °C em atmosfera de nitrogênio. A vazão e a massa inicial utilizadas foram, respectivamente, de 50 mL/min e 1,579 mg.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O capítulo 4 aborda a pré-purificação e purificação do tacrolimo. Tais processos tiveram em conta as características e propriedades do meio fermentativo. No estudo da pré-purificação gerou-se 3 caldos fermentados obtidos com as fontes de carbono: maltose, glicose e óleo de castanha-do-brasil. Diferentes métodos de separação foram aplicados em cada meio e, a partir dos dados levantados, definiu-se a estratégia de pré-purificação.

A segunda parte do estudo abordou a purificação cromatográfica e como se deu a escolha das fases estacionárias e fases móveis. Os resultados de cada sistema cromatográfico são apresentados e discutidos. Ao final da purificação estudaram-se métodos para a cristalização do tacrolimo. Por fim, é apresentado neste capítulo o processo completo de purificação.

4.1 PRÉ-PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO

4.1.1 Fermentação

A fermentação foi responsável por gerar a matéria prima utilizada no processo de pré-purificação. A meta deste processo foi reduzir o volume de caldo e impurezas que poderiam saturar rapidamente o sistema cromatográfico utilizado na etapa seguinte.

Os caldos fermentados foram preparados com fontes de carbono diversificadas para se obter o tacrolimo. Do ponto de vista de bioprocessos a utilização de diferentes substratos se mostrou importante frente a complexidade química e diversidade das impurezas produzidas, ou não consumidas, na obtenção do fármaco. De acordo com Wang *et al.* (2017), as impurezas do caldo fermentado são proteínas, amino ácidos, ácidos graxos e metabólitos primários.

4.1.1.1 Meios de fermentação

A primeira formulação para a produção do caldo fermentado baseou-se no melhor resultado obtido por Turlo *et al.* (2012) que obtiveram 33,28 mg/L de tacrolimo. Os autores utilizaram o dissacarídeo maltose como fonte de carbono e ácido picolínico como aditivo. Apesar de Moreira (2018) concluir que a utilização de aditivos não favorece a produção de tacrolimo, manteve-se a formulação original de Turlo *et al.* (2012).

Os aditivos aqui citados são substâncias que promovem a biossíntese do tacrolimo. Em geral, se tratam de moléculas com anel heterocíclico de cinco carbonos com o heteroátomo nitrogênio como, por exemplo, o ácido picolínico. Ou pode ser tratar de moléculas de cadeia aberta como, por exemplo, a L-lisina.

O meio de fermentação mais simples no que refere à bioprocessos foi produzido com o monossacarídeo glicose. A formulação baseada em Turlo *et al.* (2012) foi mantida, entretanto a fonte primária de carbono foi alterada para glicose e retirou-se o aditivo da fermentação.

O meio mais complexo produzido foi utilizando óleo vegetal de castanha-do-brasil (OCB). Os óleos vegetais são quimicamente mais complexos para a purificação do que os açúcares simples como, por exemplo, a maltose e a glicose. O OCB contém açúcares, proteínas, glicerídeos, amino ácidos, lipídeos e ácidos graxos em sua composição (Müller *et al.*, 1995). Além disso, é fonte de vários aditivos como, por exemplo, vitamina B, L-lisina, prolina, histidina e outros (Chunhieng *et al.*, 2004). A formulação do meio fermentativo foi mantida e alterou-se a fonte de carbono para o óleo de castanha-do-brasil.

A utilização de óleo vegetal para a produção de tacrolimo foi reportado por Singh e Behera (2009) e Mishra e Verma (2012). Singh e Behera (2009), por exemplo, utilizaram óleos de amendoim, soja e algodão, enquanto que Mishra e Verma (2012) utilizaram óleo de girassol, amendoim, algodão e colza (canola). No entanto, o óleo de castanha-de-brasil ainda não foi citado na literatura.

Os óleos vegetais utilizados como fonte de carbono e nitrogênio por Singh e Behera (2009) e Mishra e Verma (2012) apresentaram maiores produções de tacrolimo em relação aos meios fermentativos que utilizaram açúcares (Jung *et al.*, 2009, Singh e Behera 2009, Mishra e Verma 2012 e Wang *et al.* 2017).

4.1.1.2 Parâmetros da fermentação

A definição da temperatura de fermentação baseou-se no trabalho de Mishra e Verma (2012). O meio de fermentação baseou-se em Turlo *et al.* (2012), e foi preparado com maltose e ácido picolínico nos moldes da Tabela 3.10. Para este estudo inicial foi optado por fermentação em shaker devido ao menor consumo de recursos e praticidade em coletar amostras ao longo da fermentação frente ao aparato montado para a fermentação. A Figura 4.1 apresenta o perfil da fermentação.

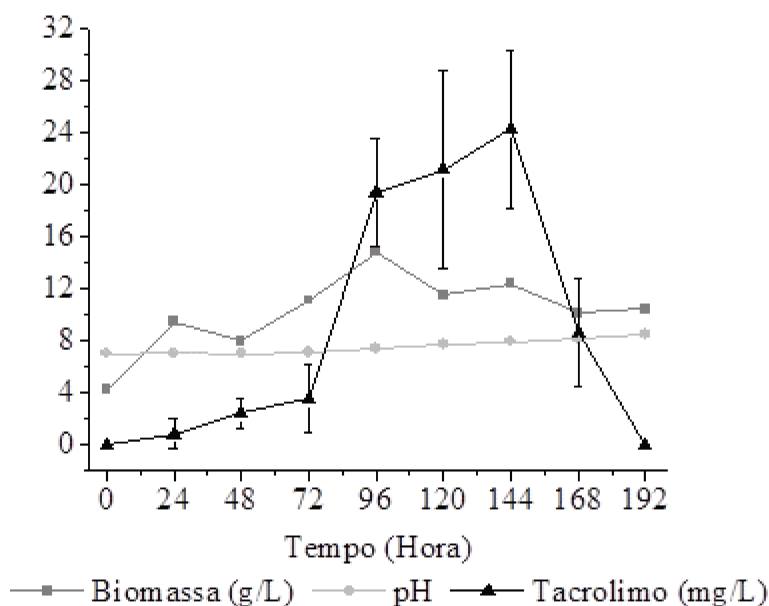


Figura 4.1 – Produção de tacrolimo em fermentação em *shaker*.

Neste estudo avaliou-se a viabilidade da fermentação, tempo necessário para se encerrar o processo, perfil da fermentação e também gerar caldo fermentado para testes preliminares de pré-purificação. De acordo com a Figura 4.1, em 96 horas de fermentação houve a produção máxima de biomassa ($14,78 \text{ g/L} \pm 0,14$) e um aumento significativo na produção de tacrolimo ($19,43 \text{ mg/L} \pm 4,12$).

A concentração do fármaco se manteve elevada entre 96 e 144 horas. Após 144 horas, onde a produção foi máxima ($24,27 \text{ mg/L} \pm 6,07$), a concentração decaiu. Turlo *et al.* (2012) obtiveram a máxima concentração de tacrolimo em aproximadamente 170 horas de fermentação. Os autores não informam o erro do método de quantificação, no entanto o valor máximo obtido ($33,28 \text{ mg/L}$) é relativamente próximo do apresentado na Figura 4.1.

Na literatura, foram encontrados autores que reportaram a produção máxima de tacrolimo entre 160 e 180 horas (Turlo *et al.* 2012; Xia *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017). No entanto, Singh e Behera (2009), e Su e Ye, (2015) apresentam perfis de produção do fármaco, em que após 96 horas a concentração forma um platô, como o ocorrido na Figura 4.1 entre 96 e 144 horas.

Dado as informações da Figura 4.1 definiu-se encerrar a fermentação em 96 horas e não em 144 horas, onde a produção de tacrolimo é máxima. Tal decisão foi tomada com base em reduzir o tempo de fermentação e priorizar a purificação. Além disso, espera-se que em 96 horas haja matéria prima não convertida, aumentando desta forma a complexidade do caldo fermentado do ponto de vista de bioprocessos.

4.1.1.3 Desempenho da fermentação

A Tabela 4.1 apresenta a produção de tacrolimo, produção de biomassa e a produção específica após as 96 horas de fermentação. A produção específica foi definida como a razão entre concentração de tacrolimo e a biomassa dado em mg/g.

Tabela 4.1 – Produção de tacrolimo, biomassa e específica da obtenção do tacrolimo.

Produção	Maltose	Glicose	OCB
Produção tacrolimo (mg/L)	38,40 ± 2,34	33,06 ± 2,08	47,40 ± 0,31
Produção biomassa (g/L ou DCW)	7,40 ± 1,25	11,60 ± 2,52	8,97 ± 1,12
Produção específica (mg/g)	5,19 ± 0,05	2,85 ± 0,14	5,29 ± 0,06

Singh e Behera (2009) testaram diversas fontes de carbono e aminoácidos para a produção de tacrolimo, incluindo óleos vegetais e aditivos, e temperatura próxima dos experimentos desta Tese. Além disso, as fermentações dos autores apresentaram perfil de produção de tacrolimo similar à fermentação da Figura 4.1. Portanto, tal trabalho foi utilizado como referência na avaliação dos resultados aqui obtidos.

Singh e Behera (2009) utilizaram óleo de amendoim, óleo de algodão e óleo de soja, e obtiveram, respectivamente, a produção específica de 5,48 ± 0,14, 4,78 ± 0,09 e 5,88 mg/g ± 0,06. Dos aditivos testados a maior produção específica obtida por Singh e Behera

(2009) foi com a L-lisina em meio ácido, $5,31 \text{ mg/g} \pm 0,10$. A menor foi com DL-metionina, produção específica de $2,83 \text{ mg/g} \pm 0,02$.

Na Tabela 4.1, a fermentação com óleo de castanha-do-brasil apresentou a maior produtividade específica. A fermentação com a maltose e ácido picolínico apresentou valores próximos aos resultados obtidos na produção com óleo da castanha. Os meios com maltose e o OCB se assemelham aos resultados obtidos por Singh e Behera (2009) com L-lisina em meio ácido e óleo de soja, respectivamente. Já a fermentação com glicose, apesar da alta produção de biomassa, gerou pouco tacrolimo. É provável que a *Streptomyces tsukubaensis* utilize a glicose em favor do aumento de biomassa ao invés da produção de tacrolimo.

Uma característica interessante é a diferença de aproximadamente 90% na concentração de tacrolimo do caldo fermentando com maltose na Tabela 4.1 em relação à concentração do caldo fermentado em shaker com 96 horas apresentado na Figura 4.1. Tal comportamento pode estar ligado com 3 fatores. O primeiro é as amostragens realizadas apenas na fermentação em shaker, onde se retirava 7 mL do caldo a cada 24 horas, perdendo assim a quantidade de meio em 63 mL de meio fermentado e consequentemente reduzindo a quantidade de biomassa. Outro fator que pode ter contribuído se refere ao micro-organismo estar mais bem adaptado ao meio de cultura quando inoculado no reator de 2 L já que a *Streptomyces tsukubaensis* já havia sido incubada no inóculo com o mesmo meio por pelo menos 24 horas. Por fim, a própria geometria e agitação do frasco Schott pode ter proporcionado um teor de oxigênio dissolvido ao meio de fermentação mais adequado do que no Erlenmeyer usado para a fermentação em *shaker*.

É interessante notar que o OCB já apresenta em sua constituição moléculas de interesse para a fermentação do tacrolimo como, por exemplo, a L-lisina que é um precursor do tacrolimo. De acordo com Chunhieng *et al.* (2004) a composição mineral da castanha-do-brasil é: 97,47 mg/g de nitrogênio; 23,80 mg/g de fósforo; 19,69 mg/g de potássio; 6,06 mg/g de cálcio; 13,38 mg/g de magnésio; 0,02 mg/g de sódio; 0,08 mg/g de ferro; 0,05 mg/g de manganês; 0,12 mg/g de zinco; e 0,13 mg/g de selênio. Muitos destes sais são adicionados ao meio de fermentação para fornecer os micronutrientes necessários à bactéria. Além disso, na composição também é encontrada vitaminas A, B1, B2, e

aminoácidos como, por exemplo, L-lisina, prolina, histidina (Müller *et al.*, 1995; Chunhieng *et al.*, 2004).

4.1.2 Etapas do processo de pré-purificação

A pré-purificação foi iniciada na sequência da fermentação. O meio fermentativo com maltose e ácido picolínico foi o primeiro caldo a ser estudado. Subsequentemente os outros foram testados. Baseado no método de quantificação do tacrolimo, o caldo fermentado foi extraído com acetona. Em seguida, o material foi evaporado obtenção de um material viscoso e escuro. O material formado foi diluído em diferentes solventes orgânicos citados na Tabela 4.2. No método de quantificação avaliou-se a área percentual do pico cromatográfico e concentração do tacrolimo, como pode ser observado na Tabela 4.2. A área percentual do tacrolimo foi calculada pela razão entre a área do tacrolimo e a área total do cromatograma. A concentração do fármaco foi determinada através da curva de calibração apresentada no tópico “3.4.2 Quantificação de tacrolimo”.

Tabela 4.2 – Extração preliminar do composto oleoso produzido via fermentação utilizando maltose como fonte de carbono.

Solvente	Concentração de tacrolimo (mg/L)	Área do tacrolimo (%)
Acetona	27,46 ± 2,50	1,61
Acetonitrila	94,58 ± 7,81	0,47
Etanol	45,66 ± 0,60	-
Isopropanol	58,11 ± 1,49	-
Acetato de etila	17,69 ± 1,09	0,07
Hexano	72,25 ± 5,52	9,32

Nas extrações com o isopropanol e etanol o detector do HPLC foi saturado, portanto não foi possível determinar a área total do cromatograma. Neste caso específico não foi possível realizar diluições para a quantificação do sistema, pois a concentração do tacrolimo ficou abaixo de limite de detecção do equipamento. O hexano mostrou a melhor seletividade tendo como referência a área do pico cromatográfico. A acetonitrila apresentou

a melhor capacidade de extrair o tacrolimo do caldo fermentado, no entanto apresentou menor seletividade em relação ao hexano. Nesta etapa do processo, jugou-se mais importante realizar a extração com acetonitrila no qual o tacrolimo é altamente solúvel, ao invés de utilizar o hexano que tende a ser mais seletivo. Além disso, o tacrolimo é apenas parcialmente solúvel em hexano.

O experimento da Tabela 4.2 foi repetido com uma solução aquosa de acetonitrila. As fermentações que utilizavam açúcar como fonte de carbono apresentaram uma mistura bifásica. Na foto da Figura 4.2 pode-se observar a diferença entre a fase leve (menos densa) e a fase pesada (mais densa).

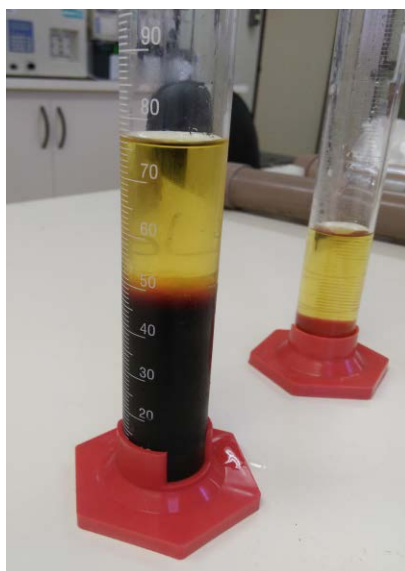


Figura 4.2 – Mistura bifásica obtida ao se diluir o composto oleoso da fermentação com maltose com solução aquosa de acetonitrila.

A mistura foi incubada em câmara fria para promover a separação das fases. As fases foram separadas por um funil de separação graduado e o tacrolimo foi quantificado em ambas as fases. A concentração de tacrolimo da fase pesada foi $5,88 \text{ mg/L} \pm 0,01$, enquanto que concentração do fármaco na fase leve foi de $144,49 \text{ mg/L} \pm 1,24$.

O experimento foi reproduzido com a solução aquosa com os caldos fermentados com glicose e óleo de castanha-do-brasil. O caldo processado a partir da fermentação conduzida com o óleo vegetal apresentou a formação de uma mistura trifásica ao invés da bifásica, como observado na Figura 4.3. Neste caso, as três fases foram separadas por

decantação. A fase intermediária, constituída pelo óleo não consumido durante a fermentação, foi extraída com acetonitrila. O extrato foi misturado à fase leve.



Figura 4.3 – Mistura trifásica obtida ao se diluir o composto oleoso da fermentação com óleo de castanha-do-brasil com solução aquosa de acetonitrila 50%.

Apesar de visualmente a amostra ter se tornado mais incolor foi necessário aumentar nível de pureza. Para tanto, a fase leve foi purificada com resinas de adsorção. Os adsorventes testados foram carvão ativado, obtido a partir de palha de coco, e o adsorvente DIAION[®] HP-20.

O carvão ativado adsorveu o material colorido, no entanto removeu 98% da massa do tacrolimo presente na amostra. Houve tentativas de dessorver o fármaco por variação de pH e temperatura, mas nenhum sucesso foi obtido.

A DIAION[®] HP-20 reduziu em 21,52% a área das impurezas, enquanto a área do tacrolimo se manteve constante, porém ainda havia impurezas para uma purificação cromatográfica. Dado os resultados da adsorção com a DIAION[®] HP-20, uma nova estratégia, no modo a se empregar o adsorvente, foi testada. Após a adição da DIAION[®] HP-20 à fase leve, evaporou-se toda a fase líquida. Todo o material, antes solubilizado na fase leve, aderiu-se sobre a DIAION[®] HP-20.

Testaram-se diferentes solventes para extrair o tacrolimo, entre eles estão: metanol, etanol, isopropanol, hexano, acetonitrila e acetato de etila. O metanol, etanol e isopropanol extraíram tanto o tacrolimo como também as impurezas. Na Figura 4.4 pode-se observar o cromatograma do sobrenadante dos 3 melhores solventes.

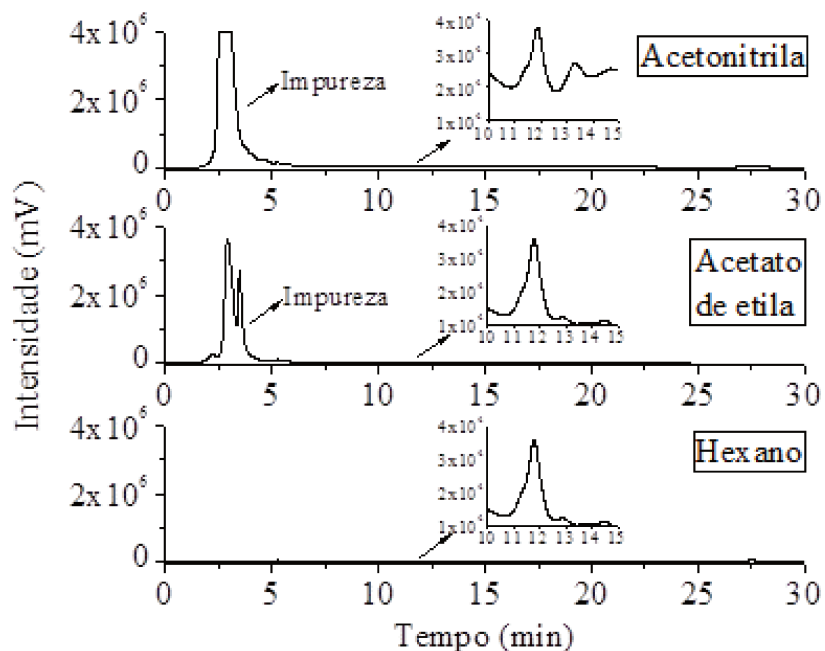


Figura 4.4 – Cromatogramas do produto extraído da DIAION[®] HP-20.

O pico cromatográfico da amostra da extração com acetonitrila apresentou a maior área de impurezas, chegando a saturar o limite de detecção. A amostra proveniente do extrato extraído com acetato de etila apresentou menor área cromatográfica de impurezas em relação à área do extrato produzido com acetonitrila. A extração com hexano praticamente não removeu as impurezas presentes dos dois extratos anteriores.

De acordo com os resultados obtidos pela Figura 4.4 o hexano seria o melhor candidato para a extração. No entanto, ao se reproduzir tal experimento com concentrações elevadas de tacrolimo (500 mg/L), a solubilidade parcial do fármaco em hexano mostrou-se um fator que poderia limitar uma possível ampliação de escala do processo. Optou-se então pela extração com acetato de etila que apresentou menor área de impurezas em relação à acetonitrila e maior concentração (102,81 mg/mL).

Na Figura 4.5, é possível observar a diferença da DIAION[®] HP-20 antes e depois do procedimento, onde o material colorido ficou retido. O adsorvente pode ser reutilizado após uma simples lavagem com água.

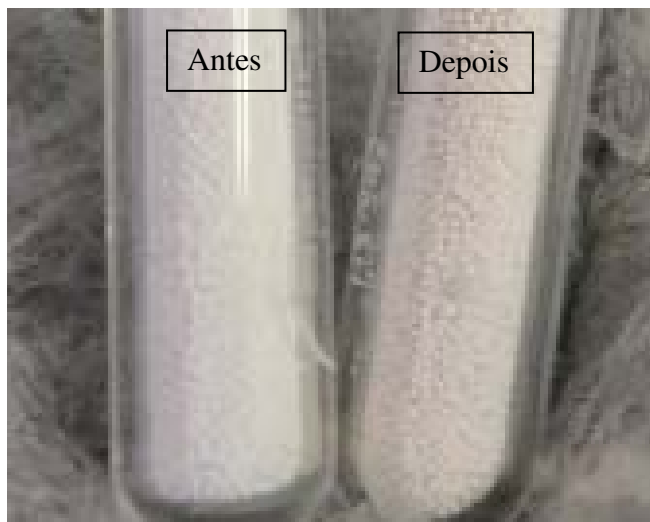


Figura 4.5 – Comparação da coloração na amostra de DIAION[®] HP-20 antes e após a etapa de purificação.

O acetato de etila utilizado para extrair o tacrolimo foi evaporado e o material não volatilizado foi solubilizada em acetonitrila, solvente empregado na etapa seguinte da purificação. Ao final da pré-purificação, denominou-se o caldo tratado de amostra pré-purificação (APP).

4.1.3 Definição das etapas do processo de pré-purificação

4.1.3.1 Processo de pré-purificação

Em linhas gerais, o processo de pré-purificação se resume nos seguintes passos:

Passo (a): A fermentação foi encerrada com a adição de acetona para extrair o tacrolimo intracelular. A mistura foi filtrada em papel filtro com abertura de poro com no máximo 3 μm de diâmetro. A biomassa foi lavada com acetona.

Passo (b): O clarificado foi reduzido a cerca de 2% de seu volume inicial até a obtenção de um óleo escuro e viscoso. Ainda neste Passo, pode ser obtido mistura bifásica ou trifásica. Fermentações que utilizam óleos como fonte de carbono (por exemplo, óleo de soja, girassol, algodão, castanha-do-brasil, etc.) formam uma fase intermediária entre a fase leve, rica em tacrolimo, e a fase pesada.

Passo (c): As fases formadas foram separadas em um funil de separação graduado. A fase intermediária, caso formada, foi extraída com acetonitrila.

Passo (d): A resina DIAION[®] HP-20 com diâmetro médio de partícula de 500 µm foi adicionada à mistura gerada no Passo (c). A proporção do adsorvente utilizado foi 70% em volume. A mistura foi concentrada sob vácuo. O material que foi impregnado no adsorvente ao fim da evaporação foi extraído com acetato de etila. O acetato de etila rico em tacrolimo foi totalmente evaporado. O material não volátil, incluindo o fármaco, foi solubilizado em acetonitrila e filtrado.

4.1.3.2 Avaliação do processo de pré-purificação

Para avaliar a pré-purificação utilizou-se 3 caldos fermentados e coletou-se 3 pontos ao longo do processo. Os caldos fermentados referem-se aos meios produzidos com as diferentes fontes de carbono: maltose, glicose e óleo de castanha-do-brasil (OCB). Os pontos escolhidos para serem analisados foram:

- Extrato que foi preparado com a mistura de caldo fermentado e acetona. Todo o conteúdo foi filtrado para separar o material particulado do líquido.
- Fase leve que se refere à fase menos densa da mistura formada da diluição com acetonitrila e água do óleo viscoso obtido da evaporação sob vácuo. Tal amostra é ponto intermediário no processo de pré-purificação.
- Amostra pré-purificada (APP) que é o produto final da pré-purificação e diluída em acetonitrila.

À medida que o caldo foi processado avaliou-se a diminuição de açúcares redutores pelo método modificado de Somogyi-Nelson, proteínas totais pelo método de Bradford e o tacrolimo através do método de quantificação definido nesta Tese. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3. O rendimento foi definido como a razão da massa de tacrolimo do final da operação em relação à massa do início. As maiores reduções de açúcares redutores e proteínas totais ocorreram entre o caldo fermentado e a fase leve. As fermentações com maltose e glicose apresentaram grande quantidade de açúcares redutores em relação à fermentação com óleo de castanha-do-brasil. Este comportamento se manteve para proteínas totais.

Tabela 4.3 – Pré-purificação do tacrolimo com diferentes fontes de carbono.

Amostra	Fonte de carbono	Proteínas totais (mg)	Açúcares redutores (mg)	Tacrolimo (mg)	Rend. (%)
Extrato	Maltose	93,68 ± 11,02	680,09 ± 87,37	9,60 ± 0,58	100,00
Fase leve	Maltose	1,65 ± 0,83	42,14 ± 3,91	8,79 ± 0,63	91,54
APP	Maltose	0,92 ± 0,18	3,82 ± 0,017	7,19 ± 1,86	74,93
Extrato	Glicose	75,77 ± 37,20	448,82 ± 68,4	4,96 ± 0,94	100,00
Fase leve	Glicose	5,25 ± 2,62	61,04 ± 16,77	4,88 ± 0,82	98,30
APP	Glicose	1,96 ± 0,25	26,45 ± 2,64	3,70 ± 0,11	74,70
Extrato	OCB	19,29 ± 11,02	186,72 ± 46,25	11,85 ± 0,99	100,00
Fase leve	OCB	14,11 ± 7,05	37,28 ± 3,51	10,25 ± 1,49	86,50
APP	OCB	1,95 ± 0,40	3,53 ± 1,18	9,67 ± 0,92	81,64

A concentração do fármaco aumentou 70 vezes ao longo da pré-purificação visto à redução de volume. Em média o volume inicial foi reduzido em 84,5% até a fase leve e 98,8% até chegar à amostra pré-purificada. Nas três pré-purificações a perda de tacrolimo entre as amostras foram proporcionais entre os caldos fermentados. Entre o extrato e a fase leve foram reduzidos em média 16,9% da massa de tacrolimo e 28,6% entre o início e o fim da pré-purificação. A redução de proteínas totais e açúcares redutores entre o extrato e fase leve foi em média 92,5% e 93,11%, respectivamente. Enquanto que entre o início e o final do processo de pré-purificação, proteínas totais e açúcares redutores foram ambos reduzidos em média 98,3%. Visualmente foi possível observar a clarificação do caldo fermentado ao longo dos processos da pré-purificação. A foto da Figura 4.6 apresenta o extrato concentrado, fase leve e amostra pré-purificada proveniente do caldo obtido pela fermentação realizada com maltose e ácido picolínico. A pré-purificação do tacrolimo, descrito entre o passo (a) e (d), foi eficiente no condicionamento do caldo fermentado para a purificação com cromatografia líquida adsortiva.



Figura 4.6 – Amostras da pré-purificação do caldo fermentado com glicose: Caldo concentrado (esquerda), fase leve (meio) e amostra pré-purificada (direita).

4.2 PURIFICAÇÃO DO TACROLIMO

4.2.1 Definição das fases estacionárias

Na purificação de alta resolução buscou-se estabelecer o sistema cromatográfico para purificar o tacrolimo com alto teor de pureza a partir do caldo pré-purificado. O passo inicial foi identificar as fases estacionárias para a separação. Usou-se como critério a seletividade e resolução. Tais parâmetros foram determinados sob a consideração de mistura pseudobinária, em que as impurezas eram representadas pelo pico mais relevante no cromatograma em relação ao tacrolimo.

Na purificação foram testados adsorventes com diferentes níveis de polaridade. Os Estudados foram sílica funcionalizada com o grupo amino (coluna NH_2), sílica funcionalizada com octadecilsilano (coluna C18) e poli(estireno-co-divinilbenzeno) (PEDVB). Os solventes testados foram metanol, etanol, isopropanol, tetrahidrofurano, acetato de etila, n-hexano, acetonitrila, ácido acético e água.

A partir do estudo preliminar encontraram-se duas fases estacionárias promissoras, a sílica ligada ao grupo NH_2 e a C18. Ambos adsorventes reconheceram o tacrolimo utilizando diferentes fases móveis como, por exemplo, metanol e água. Entretanto, definiram-se para as duas colunas a fase móvel constituída de acetonitrila e água.

Uma característica importante a cerca dos adsorventes selecionados são as propriedades físico-químicas de seus respectivos sítios ativos. A coluna amino é funcionalizada com o grupo NH_2 que lhe confere uma área superficial com caráter polar. No caso específico da coluna NH_2 quando utilizada com fase móvel aquosa com alto teor de solvente orgânico ocorre a cromatografia por interação hidrofílica, HILIC (do inglês *hydrophilic interaction chromatography*). Neste modo de operação, a fase estacionária interage fortemente com a água presente na fase móvel. A água adsorvida na superfície do adsorvente é quem promove a separação cromatográfica pelo fenômeno de partição. Sendo o tacrolimo praticamente insolúvel em água, o fármaco não interage com superfície do adsorvente. Em contrapartida, a coluna C18 empenha octadecilsilano em sua estrutura para lhe proporcionar uma superfície hidrofóbica, que é favorável à interação de moléculas com caráter apolar, como é o caso do tacrolimo. A seguir são apresentados os resultados desses dois sistemas cromatográficos.

4.2.1.1 Coluna C18

A coluna C18 (250×10 mm) foi preenchida pelo método de empacotamento a seco no LTM. A conformidade do empacotamento foi avaliada pela pressão da coluna, perfil de eluição do pico cromatográfico, porosidade total (ϵ_T) e fração de vazios (ϵ).

A porosidade total (ϵ_T) foi determinada pelo método dos momentos através da Equação 2.8 e obteve-se o valor de 0,643. O valor de 0,357 para a porosidade da partícula (ϵ_p) foi gentilmente fornecida pela Grace Materials Technologies. A fração de vazios foi determinada pela Equação 2.7 e obteve-se o valor de 0,446. Ramos (2014) obteve o valor de 0,686 para a porosidade total de um leito empacotado com C18 e as mesmas dimensões. No Apêndice A são apresentados os detalhes do procedimento de obtenção dos valores de ϵ_T e ϵ .

O estudo com a coluna C18 foi iniciado com o padrão de tacrolimo. Avaliou-se a temperatura (T) e a porcentagem de água na fase móvel. A Tabela 4.4 apresenta a largura do pico cromatográfico a meia altura (W_h), tempo de retenção total (t_R) do tacrolimo e o número de pratos teóricos (N) determinado pela Equação 2.5. O erro do parâmetro W_h não foi apresentado porque era desprezível.

Tabela 4.4 – Estudo preliminar da temperatura e porcentagem de água na fase móvel (150 mg/L de tacrolimo padrão, vazão de 5 mL/min e *loop* de 20 μ L).

T (°C)	Água (%)	W_h (min)	t_R (min)	N
40	30	0,669	7,061 \pm 0,675	354
	40	1,011	12,244 \pm 1,009	610
	50	2,269	31,68 \pm 2,269	970
50	30	0,464	6,7 \pm 0,464	651
	40	0,711	11,806 \pm 0,706	1145
	50	1,650	30,688 \pm 1,650	1714
60	30	0,359	6,318 \pm 0,360	924
	40	0,557	11,221 \pm 0,557	1627
	50	1,289	29,206 \pm 1,289	2530

Na Tabela 4.4 nota-se o aumento expressivo do tempo de retenção a medida que o teor de água se eleva. A interação de adsorção do fármaco com a superfície hidrofóbica da sílica C18 é favorecida quanto mais aquosa for a fase móvel. O comportamento ocorre devido à insolubilidade do tacrolimo em água. O aumento na proporção de água também contribuiu para o alargamento do pico cromatográfico. Entretanto, nas condições do estudo da Tabela 4.4, o aumento do tempo de retenção do tacrolimo é mais significativo para o aumento da eficiência da coluna do que a redução do número de pratos promovido pelo alargamento da banda cromatográfica.

O aumento da temperatura promoveu a diminuição do tempo de retenção do tacrolimo e da largura do pico cromatográfico. Tais resultados corroboram com os dados termodinâmicos da Tabela 4.5 determinados na coluna C18 analítica (250 \times 4,6 mm). O experimento foi realizado nas condições da Tabela 4.4. As entalpias de adsorção (ΔH) foram obtidas pelas Equações 2.2 e 2.9 com as temperaturas de 40, 50 e 60 °C, em diferentes proporções de água na fase móvel e vazão de 1 mL/min.

Os valores de entalpia de adsorção (ΔH) do tacrolimo são negativos e inferiores a 50 kJ/mol sugerindo que o fenômeno de adsorção é físico e exotérmico. Logo, quanto maior a

temperatura utilizada no sistema, menor é o tempo de retenção do composto no leito cromatográfico e a contribuição para a dispersão axial (Ruthven, 1984; Lämmerhofer, 2010; Ferrari, 2014).

Tabela 4.5 – Valores de entalpia de adsorção do tacrolimo em coluna analítica C18.

Proporção de água na fase móvel (%)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/Kmol)	R^2
30	-6,484	-6,058	0,999
40	-4,431	6,107	0,993
50	-3,722	17,038	0,989

A proporção de solvente usada na fase móvel foi determinada na Figura 4.7 com base na seletividade (α), resolução (R_s) e tempo de retenção (t'_R). Os valores de seletividade foram determinados com as Equações 2.2 e 2.5, enquanto que as resoluções foram obtidas pela Equação 2.6.

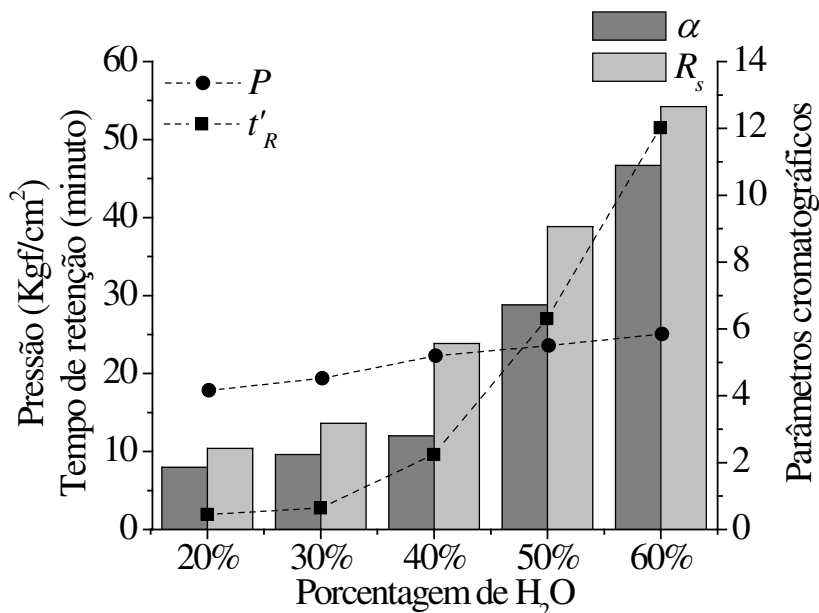


Figura 4.7 – Resolução, seletividade, pressão e tempo de retenção do tacrolimo em relação à impureza da amostra pré-purificada proveniente de fermentação com maltose.

Na Figura 4.7, a pressão aumenta com o aumento da proporção de água em uma evolução quase linear. O parâmetro ficou bem abaixo do limite de operação, 250 kgf/cm².

Em relação ao tempo de retenção ocorre um aumento significativo quando a proporção de água na fase móvel excedeu os 40%. Este comportamento está ligado à insolubilidade do tacrolimo em água, que tende a interagir com a fase estacionária por mais tempo.

O melhor resultado da seletividade e resolução foi com a fase móvel com 60% de água. Entretanto, o tempo de retenção foi extremamente elevado, contribuindo muito para o alargamento da banda cromatográfica. Definiu-se para a separação a fase móvel de acetonitrila e água na proporção volumétrica de 60/40 e temperatura de 60 °C. No entanto, a proporção de água na fase móvel pode ser maleável, visto que todas as proporções testadas atendem a separação cromatográfica.

Após a definição da fase móvel e a temperatura de operação, estudou-se a sobrecarga da coluna. Tal estudo teve caráter preliminar visto que não havia sido definido ainda o quão eficiente o processo de pré-purificação deveria ser. Neste caso, foram injetadas amostras de padrão de tacrolimo (100 mg/L) e a fase leve obtida do caldo fermentado com maltose (100 mg/L) utilizando alças de amostragens de 20, 200 e 600 μL como por ser observado na Figura 4.8. A alças de amostragens, também conhecida por *loop*, cromatográfico consiste em uma tubulação que limita o volume do material injetado na coluna cromatográfica a cada batelada.

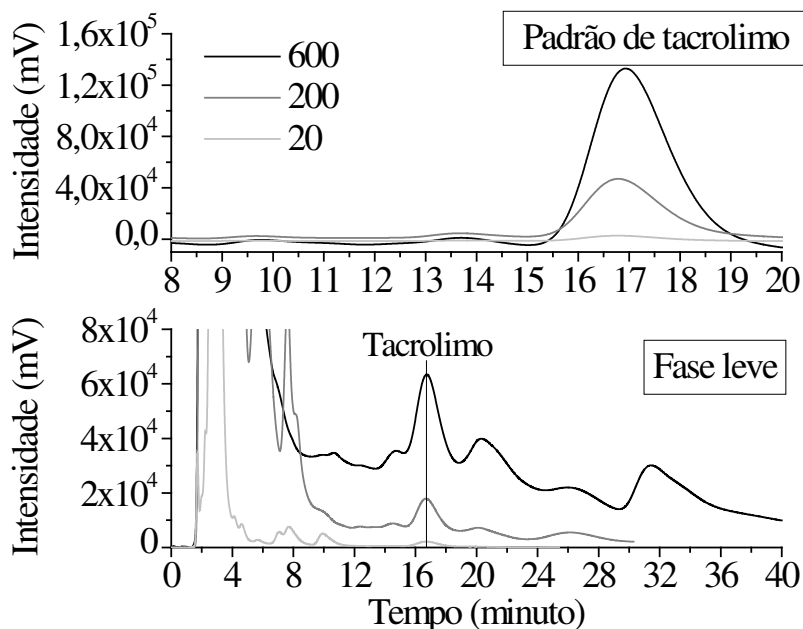


Figura 4.8 – Perfil de eluição do tacrolimo e fase leve.

De acordo com a Figura 4.8, a coluna cromatográfica se mostrou capaz de separar o tacrolimo dos epímeros formados. O tacrolimo diol e C-10 eluem em 13,70 e 9,78 minutos, respectivamente. Outros picos também são observados. Há indícios de que tais compostos sejam possíveis fármacos produzidos pela fermentação, dentre eles a ascomicina e meridamicina, já reportados por outros autores na produção de tacrolimo com *Streptomyces tsukubaensis* (Jung *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Barreiro e Martínez-Castro, 2014).

Na sobrecarga de volume se esperava que o soluto formasse um platô ao invés do pico cromatográfico quase simétrico em 16,74 minutos. Tal comportamento é um indicativo de que a coluna suporta volumes maiores de injeção. Apenas com o *loop* de 20 μL os picos das impurezas e do tacrolimo ficaram bem definidos. Nos *loops* de 200 e 600 μL , observa-se que o tacrolimo eluiu sobre a calda direita do pico principal de impureza e não houve linha de base (quando a base do cromatograma toca o eixo x

4.2.1.2 Coluna NH_2

A coluna NH_2 (100 \times 10 mm) foi empacotada a seco no LPTM. A conformidade do empacotamento foi avaliada pela pressão da coluna, perfil de eluição do pico cromatográfico, porosidade total (ϵ_T), porosidade da partícula (ϵ_p) e fração de vazios (ϵ). Os parâmetros ϵ_T e ϵ foram determinados pela Equação 2.8 com os compostos inertes TTBB e azul de dextrana, respectivamente. A ϵ_p foi calculada pela Equação 2.7. A obtenção dos valores está descrita no Apêndice B e são de 0,546 e 0,434 e 0,199 para ϵ_T , ϵ e ϵ_p .

Os mesmos solventes testados na coluna C18 foram utilizados na coluna NH_2 para a purificação do tacrolimo. Comparativamente, devido ao caráter polar distinto entre as colunas cromatográficas, foi observada a inversão na ordem de eluição entre o tacrolimo e as impurezas do caldo fermentado. As fases móveis que se mostraram capazes de purificar o fármaco foram acetonitrila pura, acetonitrila misturada à água, ou algum álcool (isopropanol, metanol ou etanol) misturado com a água.

A Figura 4.9 apresenta o cromatograma do padrão de tacrolimo a 25 °C. No cromatograma, os epímeros do tacrolimo coeluem no mesmo tempo de retenção que o fármaco, 4,87 minutos. O tempo de retenção é muito próximo ao tempo de retenção do 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB), 4,32 minutos, composto inerte na coluna NH_2 .

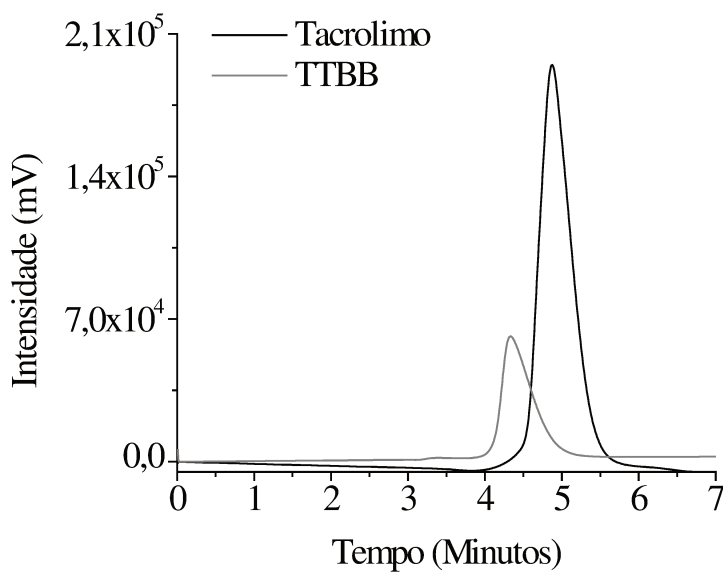


Figura 4.9 – Padrão de tacrolimo e TTBB em coluna semipreparativa com fase móvel aquosa de acetonitrila.

Avaliou-se também o efeito da temperatura na separação entre o tacrolimo e as impurezas. A temperatura limite da sílica funcionalizada com o grupo amino é de 40 °C. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 4.10, onde se identificou um sutil alargamento do pico da impureza em temperaturas mais baixas.

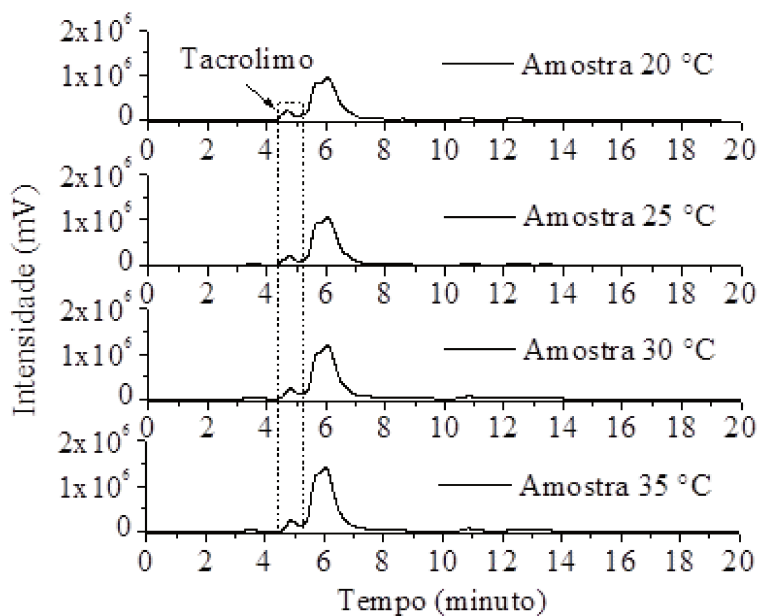


Figura 4.10 – Amostra pré-purificada da fermentação com maltose em coluna semipreparativa com diferentes em diferentes temperaturas.

Tal comportamento está relacionado à adsorção da água sobre a superfície do adsorvente. A banda de eluição do tacrolimo foi pouco afetada pela temperatura, pois quase não interage com o leito. Além disso, não foi realizado o estudo termodinâmico no sistema como na coluna C18, visto que os parâmetros cromatográficos do tacrolimo não apresenta sensibilidade aos parâmetros termodinâmicos.

Na Figura 4.11, onde se estudou a influência da água na fase móvel, observa-se o comportamento das impurezas em relação ao tacrolimo. O tempo de retenção do tacrolimo aumenta com a diminuição do teor de água. A água presente na fase móvel se adsorve fortemente nos sítios ativos da fase estacionária promovendo o recobrimento superficial do adsorvente. Quanto maior o teor de água na fase móvel menor é a disponibilidade de sítios ativos para o tacrolimo. Neste caso, moléculas solúveis em tal solvente apresentam tempo de retenção elevado, enquanto que solutos insolúveis em água permanecem por menos tempo na coluna, como por exemplo, o tacrolimo.

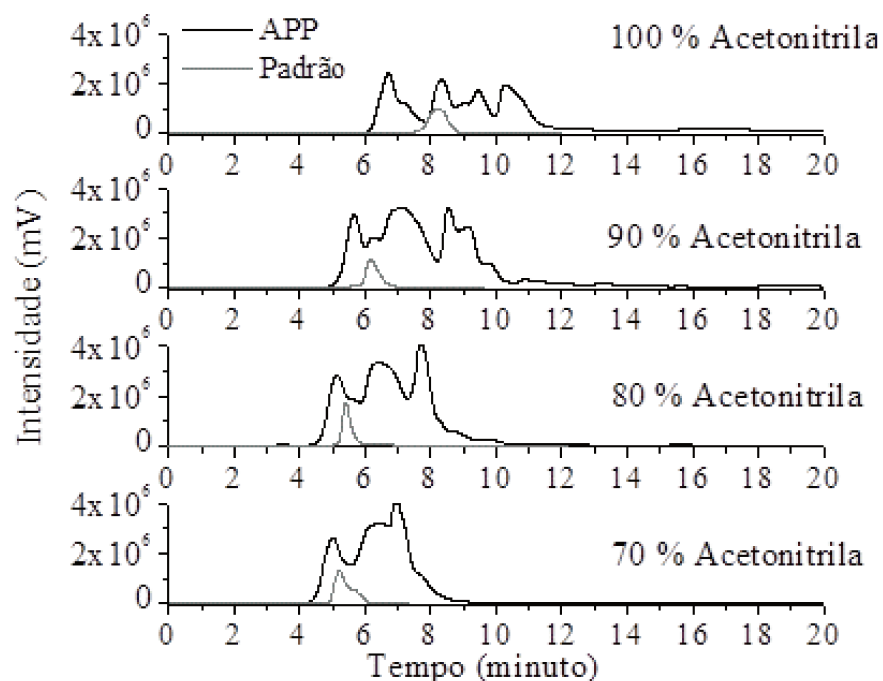


Figura 4.11 – Amostra pré-purificada do caldo produzido com maltose em coluna semipreparativa com diferentes fases móveis

Outro fato importa de se notar é a ordem de eluição entre o tacrolimo e as impurezas da coluna C18 e a NH_2 . Apesar de o tacrolimo ser insolúvel em água, o comportamento da coluna NH_2 possui caráter hidrofílico, enquanto que a coluna C18, e que utiliza os mesmos

solventes na fase móvel, apresenta característica hidrofóbica. Deste modo, as moléculas que primeiro eluem em uma das colunas serão as retardatárias na segunda, pois a ordem de eluição é invertida.

Os cromatogramas são apresentados apenas até 20 minutos para explorar a relação do tacrolimo com as impurezas coeluídas. No entanto, quanto menor o teor de acetonitrila maior é o tempo de retenção das moléculas solúveis em água. No caso da fase móvel constituída por acetonitrila pura o último pico observado foi em 45 min.

4.2.2 Purificação do tacrolimo por cromatografia

4.2.2.1 Processo de purificação cromatográfica e cristalização do tacrolimo

O processo para a purificação do tacrolimo com alta resolução foi realizado através de dois sistemas cromatográficos e foram baseados nos estudos de separação cromatográfica nas colunas C18 e NH₂.

No primeiro sistema de cromatografia líquida adsortiva, a coluna NH₂ foi usada com a fase móvel acetonitrila e água para separar as impurezas altamente solúveis em água do tacrolimo. No sistema seguinte, o tacrolimo foi isolado utilizando diferença de polaridade na coluna de fase reversa C18 e fase móvel composta por acetonitrila e água. No final do processo o tacrolimo foi cristalizado. A purificação foi definida como apresentado nos passos (a), (b) e (c) de purificação.

Passo (a): A amostra pré-purificada foi purificada na coluna recheada com sílica de cromatografia de interação hidrofílica Luna[®] NH₂ e fase móvel constituída por acetonitrila e água. A banda cromatográfica que contém o tacrolimo eluiu da coluna logo nos primeiros minutos da separação, entre 4,5 e 4,5 minutos. Para diminuir o tempo de ciclo cromatográfico regenerou-se a coluna com solução aquosa com acetonitrila após a coleta do tacrolimo.

Passo (b): O volume coletado no Passo (a) foi injetado na coluna recheada com a sílica de fase reversa octadecilsilano. Utilizou-se a mesma fase móvel do Passo (a).

Passo (c): O material eluído da coluna C18 foi diretamente coletado e misturado em acetato de etila e resfriado. Após o término da coleta, o material obtido na coluna C18 foi resfriado para facilitar a separação de fases entre a água e os solventes orgânicos acetatos

de etila e acetonitrila. A água presente na amostra foi separada dos solventes orgânicos por um funil de decantação graduado. O volume de acetato de etila com acetonitrila e rico em tacrolimo foi totalmente evaporado. Os cristais formados após a evaporação foram lavados com água e secos em temperatura ambiente.

4.2.2.2 Resultados do processo cromatográfico adsortivo

Para avaliar o processo descrito nos passos (a) e (b) foram preparadas 3 amostras pré-purificadas (APP), provenientes do caldo fermentado preparado de acordo com a Tabela 3.10.

A separação com a coluna semipreparativa NH_2 realizada no Passo (a) da purificação é ilustrada na Figura 4.12 por um dos cromatogramas da separação da APP obtida pela fermentação utilizando maltose como fonte primária de carbono. No cromatograma da APP, nota-se que o tacrolimo não foi totalmente isolado das impurezas. No entanto, a purificação em coluna NH_2 eliminou grande parte das impurezas da amostra, principalmente as impurezas mais solúveis em água. De acordo com o método cromatográfico de quantificação, a concentração de tacrolimo na amostra coletada foi de $545,37 \text{ mg/L} \pm 8,81$.

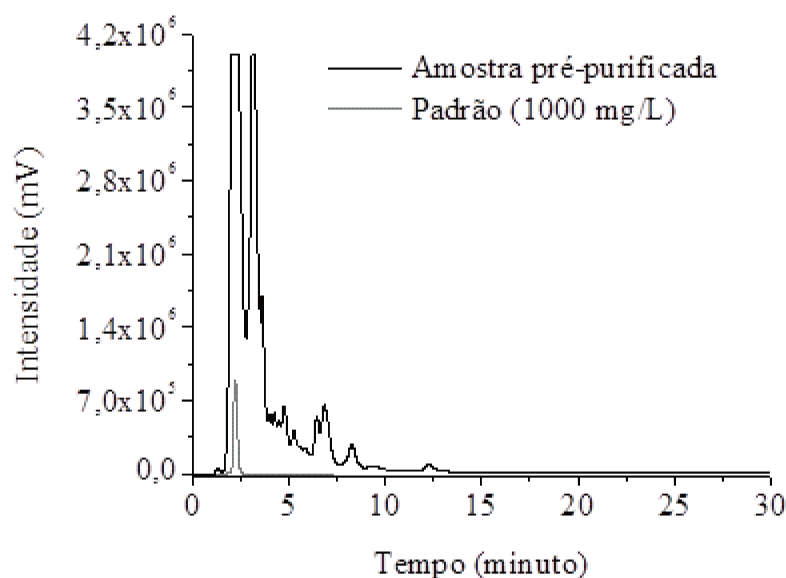


Figura 4.12 – Padrão de tacrolimo e APP do caldo utilizando maltose em coluna semipreparativa NH_2 .

A segunda purificação cromatográfica referente ao Passo (b) foi conduzida na coluna semipreparativa C18 com o material coletado do primeiro sistema cromatográfico. A coleta da banda cromatográfica ocorreu entre os tempos de 15 e 19 minutos. A Figura 4.13 apresenta o cromatograma de uma das injeções na coluna C18 no Passo (b), onde se observa o pico do tacrolimo totalmente isolado das impurezas no tempo de aproximadamente 17 minutos. Após o término da purificação foram obtidos 160 mL de tacrolimo em fase móvel de acetonitrila e água. Determinou-se a concentração de $18,91 \text{ mg/L} \pm 0,37$ com o método de quantificação do tacrolimo.

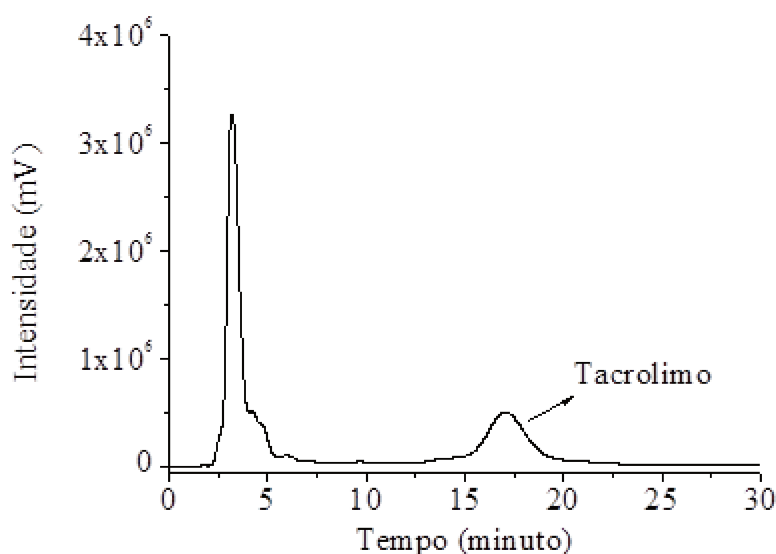


Figura 4.13 – Injeção na coluna semipreparativa C18 para purificação de tacrolimo.

Neste estudo experimental não foi realizado o Passo (c) da purificação devido à baixa massa de tacrolimo presente na amostra para ser cristalizado. O volume necessário de acetado de etila (V_{col}) pode ser estimado com a Equação 4.1 que utiliza o número de injeções (N_{inj}), vazão da fase móvel do sistema cosmográfico (Q) e tempo de coleta (t_{col}).

$$V_{col} = N_{inj} t_{col} Q \quad (4.1)$$

A Tabela 4.6 apresenta o volume total de injeção (V_{inj}), volume total coletado (V_{col}), concentração de tacrolimo injetado (C_{inj}), concentração de tacrolimo no material coletado (C_{col}) e o rendimento. Definiu-se o rendimento como a razão entre a massa de tacrolimo que entrou e saiu da coluna.

Na purificação com a coluna NH_2 o maior rendimento foi do caldo fermentado produzido com o óleo de castanha-do-brasil, enquanto que o menor foi realizado com o meio proveniente de glicose.

A purificação com a coluna C18 apresentou alto rendimento, próximo dos 100%. O tacrolimo, recém-coletado da coluna C18, apresentou pureza superior a 99% e estava solubilizado em acetonitrila e água.

Tabela 4.6 – Rendimentos da purificação do tacrolimo para fermentações utilizando diferentes amostras pré-purificadas (APP).

Col.	APP	V_{inj} (mL)	V_{col} (mL)	C_{inj} (mg/L)	C_{col} (mg/L)	Rend. (%)
NH₂	Maltose	3,0	7,50	1438,68 ± 372,80	545,37 ± 8,81	94,77
C18	Maltose	5,6	160,0	545,37 ± 8,81	18,91 ± 0,37	99,09
NH₂	Glicose	3,0	7,50	740,94 ± 21,34	235,82 ± 2,92	79,57
C18	Glicose	2,4	56,0	235,82 ± 2,92	10,04 ± 2,92	99,32
NH₂	OCB	4,2	6,0	841,48 ± 70,66	571,38 ± 178,36	97,00
C18	OCB	2,1	102,0	571,38 ± 178,36	11,59 ± 2,79	98,53

O rendimento do meio fermentado com a glicose na coluna NH_2 apresentou baixo valor em comparação aos outros resultados obtidos na Tabela 4.6. É provável que tal fato tenha ocorrido devido à falha humana no momento da coleta. O experimento não foi novamente realizado, pois gerar a matéria prima necessária através da fermentação e pré-purificação.

4.2.2.3 Cristalização do tacrolimo e fluxograma da purificação.

No Passo (c) foram testados diferentes métodos de cristalização. O maior desafio da cristalização foi a reação de epimerização do tacrolimo com a água presente na fase móvel

que produz o tacrolimo diol (tautômero I) e o tacrolimo C-10 (tautômero II) (Namiki *et al.*, 1995).

Os primeiros estudos de cristalização foram conduzidos com o padrão do tacrolimo. Neste experimento inicial utilizou-se da insolubilidade do tacrolimo em água para a formação dos cristais. O tacrolimo foi solubilizado em uma mistura de acetonitrila e água. A solução foi evaporada e depois resfriada. Os cristais foram filtrados, lavados com água e analisados pelo método de quantificação do tacrolimo.

A Figura 4.14 apresenta o cromatograma obtido, no entanto foi identificado ruídos na linha de base proveniente da decomposição do tacrolimo. Apesar de um ganho significativo, os cristais apresentaram a formação dos epímeros diol (tautômero I) e tacrolimo C-10 (tautômero II).

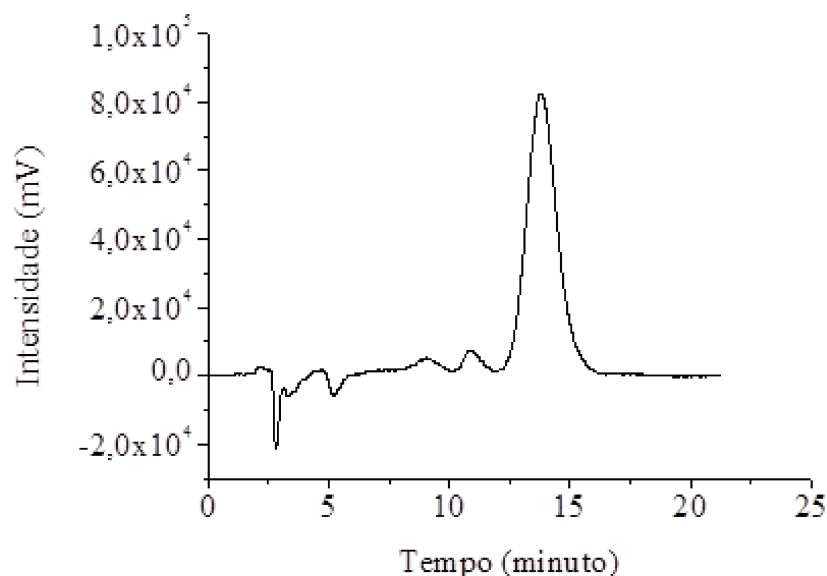


Figura 4.14 – Cromatograma da primeira cristalização utilizando padrão de tacrolimo.

No procedimento proposto nesta Tese, a solução de acetonitrila e água contendo o tacrolimo obtida ao final do passo (b) foi extraída com acetato de etila. Após a mistura, resfriou-se a solução bifásica. A fase orgânica foi evaporada para cristalizar o tacrolimo.

Os cristais formados foram filtrados, lavados em água e secos em temperatura ambiente. De acordo com o cromatograma dos cristais obtido da Figura 4.15 o tacrolimo apresenta 98% de pureza em relação a sua área cromatográfica que é o mesmo nível de

pureza do padrão da sigma-aldrich. Neste caso, apenas 2% do tacrolimo foram convertidos nos epímeros diol e C-10. É válido ressaltar que a cristalização foi empregada apenas para condicionar o tacrolimo para uma forma de estável. Tal estratégia para cristalização baseou-se em Keri *et al.* (2005) que realizaram a extração do tacrolimo utilizando um solvente imiscível em água.

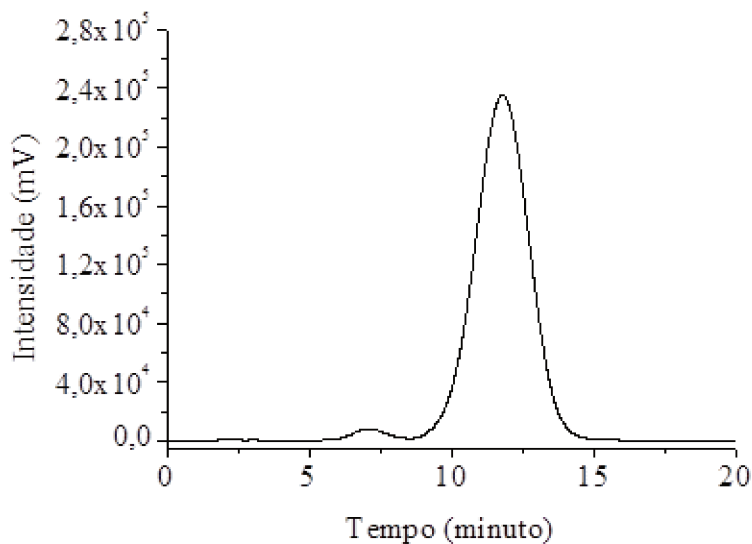


Figura 4.15 – Cromatograma do cristal obtido pelo processo de cristalização do Passo (c) da purificação.

Keri *et al.* (2005) empregaram a extração em outro contexto e sem o recurso da temperatura reduzida. Na circunstância do presente processo, o recurso da temperatura foi primordial para se estabelecer elevada pureza do tacrolimo.

4.3 PROCESSO COMPLETO DE OBTENÇÃO DO TACROLIMO

4.3.1 Processamento do tacrolimo

O processo completo de obtenção do tacrolimo é composto pelas etapas de pré-purificação e purificação. A etapa de pré-purificação compreende desde o fermentado até a amostra pré-purificada (APP). O caldo fermentado teve seu volume reduzido e retirou-se as impurezas grosseiras da amostra. O isolamento do tacrolimo e cristalização se deram na etapa de purificação. A purificação foi iniciada com a APP e finalizada com a cristalização do tacrolimo.

Para se avaliar o processo descrito nesta Tese preparou-se 3 L de caldo fermentado utilizando óleo de castanha-do-brasil como fonte primária de carbono de acordo com a formulação proposta pela Tabela 3.10. O caldo fermentado bruto apresentou $194 \text{ mg} \pm 30$ de tacrolimo.

Os 3 L de caldo fermentados foram extraído com acetona. A mistura foi agitada e incubada por 40 minutos. O material foi filtrado em papel filtro. O material filtrado foi evaporado até a formação de um óleo escuro e viscoso. Diluiu-se o óleo em solução aquosa de acetonitrila. A acetonitrila usada na extração foi misturada com a fase menos densa gerando 2 L.

Os 2 L de extrato obtidos da fermentação foram evaporados com DIAION[®] HP-20. Evaporou-se toda a fase líquida de modo que o material solubilizado aderiu-se sobre o adsorvente. O tacrolimo foi extraído da DIAION[®] HP-20 com acetato de etila. Foram obtidos 4,2 L de acetato de etila que em seguida foi totalmente evaporado para ser novamente resolubilizado em acetonitrila.

A amostra pré-purificada foi injetada na coluna NH₂. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água na proporção 95/5 em volume. Coletou-se a banda cromatográfica entre 2,0 e 2,5 minutos. Para diminuir o tempo de ciclo eluiu-se por 5 min, após a coleta, uma solução aquosa de de acetonitrila. Ao final da operação obteve-se 9 mL.

A amostra purificada na coluna NH₂ foi injetado na coluna C18 semipreparativa O sistema foi operado com uma fase móvel aquosa de acetonitrila. Coletaram-se as bandas cromatográficas entre 14,0 e 17,0 minutos em que se obteve o volume 150 mL de amostra coletada.

O volume coletado foi diretamente diluído em acetado de etila. A mistura bifásica formada foi resfriada e separada por um funil de separação graduado. A fase orgânica composta por acetato de etila e acetonitrila foi evaporada. Lavaram-se os cristais formados com água ultrapura. Por fim os cristais foram secos em temperatura ambiente.

Ao final de todo o processo obteve-se $80 \text{ mg} \pm 28$ de tacrolimo com rendimento de 41,24%. O produto final da cristalização apresentou 98% em área cromatográfica. Os 2% da área cromatográfica correspondem aos tacrolimo diol e o tacrolimo C-10, epímeros do próprio tacrolimo. O cromatograma do cristal é apresentado na Figura 4.16.

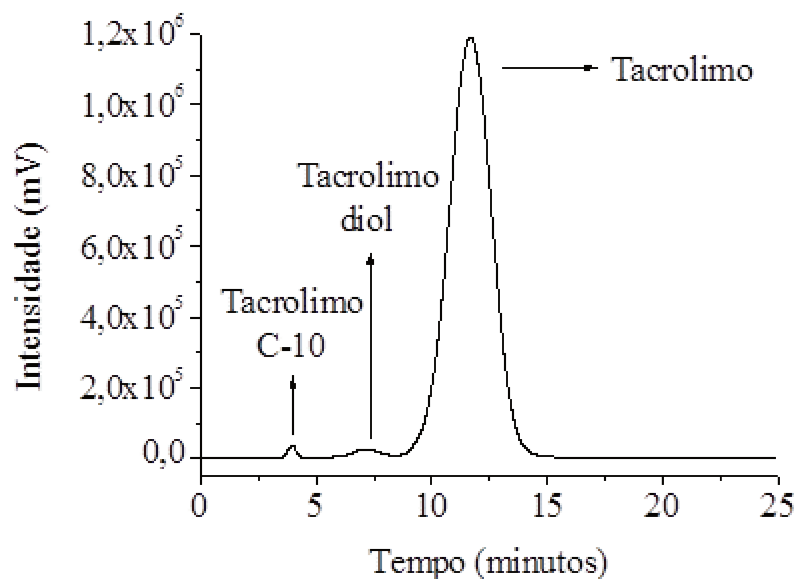


Figura 4.16 – Cromatograma do tacrolimo cristalizado com alta pureza.

Na foto da Figura 4.17 é apresentada a comparação visual do padrão de tacrolimo e o tacrolimo purificado. Observa-se que os cristais obtidos são brancos, e não apresentam coloração amarelada proveniente da degradação do fármaco.

Os cristais de tacrolimo foram submetidos à análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Na Figura 4.18 pode-se observar o perfil do tacrolimo. O pico do tacrolimo ocorre em 125,17 °C.

De acordo com a literatura, o ponto de fusão do tacrolimo está entre 127 e 129 °C (Tanaka *et al.*, 1987; Yamashita *et al.*, 2003). O evento térmico próximo a 90 °C pode ser relacionado à evaporação de água, já que o fármaco se apresenta na sua forma monohidratada.

Park *et al.* (2009), Joe *et al.* (2010) e Zidan *et al.* (2012) realizaram estudos de pré-formulação do tacrolimo monohidrato usando DSC, e detectaram um pico endotérmico discreto de água no tacrolimo monohidratado.

Böer *et al.* (2013) estudaram a correlação da análise térmica e a pirólise acoplada ao GC-MS na caracterização do tacrolimo de quatro amostras de tacrolimo provenientes de medicamentos. Moreira (2018) realizou a análise de DSC do padrão de tacrolimo. Tais autores obtiveram os picos endotérmicos da curva de DSC apresentados na Tabela 4.7.



Figura 4.17 – Comparação visual do tacrolimo padrão e o tacrolimo purificado.

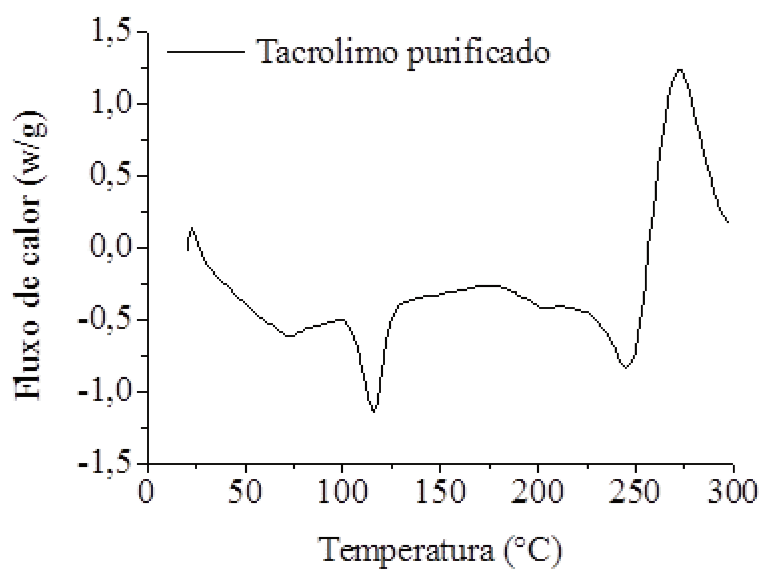


Figura 4.18 - DSC do cristal de tacrolimo obtido pelo processo de purificação.

Tabela 4.7 – Comparação dos picos endotérmicos de DSC da literatura.

Análise	Moreira (2018)	Böer <i>et al.</i> (2013)			
	Padrão	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
DSC	129,54 °C	127,5 °C	127,6 °C	127,1 °C	128,0 °C

No trabalho de Böer *et al.* (2013) o primeiro evento térmico relacionado a água se mostrou mais acentuado com fluxo de calor mais elevado na análise de DSC.

4.3.2 Avanços no processo de purificação do tacrolimo

Definido o processo completo de purificação da presente Tese realizou-se uma breve comparação com trabalhos da literatura tendo em vista as diferenças de metodologias, materiais e operações unitárias empregadas para a obtenção do tacrolimo. São destacados também os principais problemas dos processos já existentes. Os trabalhos referenciados são: Keri *et al.* (2005), Kumar *et al.* (2007), Buchta *et al.* (2008), Cabri *et al.* (2008) e Choi *et al.* (2013).

4.3.2.1 Keri *et al.* (2005)

No método utilizado por Keri *et al.* (2005), a purificação do caldo fermentado se inicia diretamente em coluna de adsorção baseadas em estireno-divinil benzeno sem que haja uma pré-purificação adequada.

Na presente Tese apenas um adsorvente baseado em estireno-divinilbenzeno, o DIAION[®] HP-20, foi usado. O adsorvente DIAION[®] HP-20 foi misturado ao extrato oriundo do caldo fermentado na etapa de evaporação para servir de matriz para o material solubilizado no extrato. Os leitos citados nesta Tese são baseados em sílica. Além disso, a purificação do tacrolimo sugerida por Keri *et al.* (2005) foi realizada em um sistema complexo de carga e descarga da coluna que utiliza diferentes fases móveis. Na operação foram necessários pelo menos 3 sistemas cromatográficos e a utilização de diversos solventes. Já os 2 sistemas cromatográficos da presente Tese foram operados com apenas uma fase móvel cada e empregou-se dois solventes, acetonitrila e água.

Keri *et al.* (2005) apresentaram um processo complexo e de difícil operação. Além disso, não houve um pré-tratamento adequado para o caldo fermentado e nem foi apresentado o cromatograma ou uma metodologia para avaliar a formação de epímeros ao final do processo. Em comparação o processo da presente Tese é mais robusto e possui etapa de pré-purificação mais eficiente para não saturar as colunas na purificação cromatográfica adsortiva.

4.3.2.2 Kumar *et al.* (2007)

O processo de purificação sugerido por Kumar *et al.* (2007) é generalista e superficial no que se refere ao isolamento do fármaco. Em adicional, os autores citam a

necessidade do controle do pH para a extração inicial e não utilizaram métodos robustos para a pré-purificação do tacrolimo como, por exemplo, a adsorção. No que diz respeito à purificação cromatográfica, não foram apresentadas informações importantes como, por exemplo, o material que constitui o leito adsortivo ou os solventes usados como fase móvel. O mesmo se aplica para a cristalização. Kumar *et al.* (2007) não apresentaram especificações sobre a reação de epimerização do tacrolimo ou pureza do fármaco.

Destaca-se ainda, que a presente Tese é adequada para a purificação do caldo fermentado obtido pela fermentação proposta por Kumar *et al.* (2007).

4.3.2.3 Buchta *et al.* (2008)

Na etapa de pré-purificação proposta por Buchta *et al.* (2008) os autores empregaram centrifugação ao invés de filtração e não foram utilizados adsorventes na pré-purificação. A pré-purificação adequada do caldo fermentado é importante para não sobrecarregar a coluna cromatográfica. Caso contrário, o tempo de vida útil do leito cromatográfico é drasticamente reduzido. O problema se torna mais crítico para a purificação de caldos fermentados provenientes de óleos vegetais que são quimicamente mais complexos do ponto de vista de bioprocessos. Além disso, os solventes insolúveis em água, utilizados para a segunda extração, não são adequados para a purificação de fármacos como, por exemplo, o tolueno.

Após o processo de purificação não é apresentado a pureza do tacrolimo e nem o cromatograma dos fármacos em um método que diferencie os epímeros diol e C-10 do tacrolimo.

4.3.2.4 Cabri *et al.* (2008)

Na etapa de pré-purificação Cabri *et al.* (2008) utilizaram outros tipos de resinas em condições diferentes da presente Tese. Subentende-se pelo trabalho de Cabri *et al.* (2008) que o adsorvente XAD16 foi empacotado em coluna e eluído com uma solução aquosa de 75% de acetona, enquanto que esta Tese usou-se o DIAION[®] HP-20 junto à fase leve na etapa de evaporação.

Cabri *et al.* (2008) utilizaram fases móveis e fases estacionárias diferentes em relação à presente Tese. O primeiro processo cromatográfico adsortivo de Cabri *et al.*

(2008) é complexo e trabalhoso, pois necessita realizar diversas eluições com diferentes fases móveis. Na segunda separação cromatográfica foi obrigatoriamente utilizado nitrato de prata e foram necessárias pelo menos duas fases móveis para a separação. No final do processo de purificação Cabri *et al.* (2008) usaram 6 fases móveis diferentes e pelo menos 4 solventes. Das 7 injeções realizadas, apenas 4 foram utilizadas devido ao nível de pureza obtido. Por fim, o processo de cristalização de Cabri *et al.* (2008) é demorado e totalmente diferente do presente trabalho.

4.3.2.5 Choi *et al.* (2013)

Na etapa de pré-purificação proposta por Choi *et al.* (2013) foi necessário ajustar o pH do caldo fermentado para uma faixa muito específica, entre 3 e 4, e utilizar terra de diatomáceas para a filtração. A terra diatomácea foi empregada diretamente no caldo fermentado sem a redução do volume resultando em um grande consumo do adsorvente.

Após a extração e redução de volume do caldo fermentado, Choi *et al.* (2013) realizaram extrações com solventes tóxicos e de alto custo como, por exemplo, clorofórmio, tetraclorometano, diclorometano, cloreto de metileno e cloreto de metileno. Na presente Tese tais solventes não foram utilizados, e o recurso empregado para a purificação foi uma diluição seguida de uma decantação. Só então se usou o adsorvente DIAION[®] HP-20. O adsorvente foi usado como uma matriz de suporte e não requer controle do pH. Além disso, utilizou-se o adsorvente em contexto diferente da terra diatomácea, óxido de alumínio ou sílica gel usadas por Choi *et al.* (2013). Ao final da pré-purificação o tacrolimo de Choi *et al.* (2013) ainda foi necessário realizar uma cristalização adicional.

Na etapa de purificação Choi *et al.* (2013) utilizaram cromatografia líquida adsortiva. Entretanto, o processo requer o controle do pH e faz uso de adsorventes baseados em poliestireno e divinilbenzeno. Dado a natureza do processo as opções de adsorventes são limitadas pela pressão do sistema cromatográfico e pelas faixas extremas de pH das fases móveis utilizadas pelos autores. No processo da presente Tese são utilizadas sílicas funcionalizadas com o grupo amino e com octadecilsilano. Ambas as sílicas são quimicamente estáveis. E, apesar de suportarem, elas não necessitam operar em condição de estresse químico e físico. Isto é, em meios ácidos e alcalinos, e em altas pressões.

Choi *et al.* (2013) cristalizaram o tacrolimo em solventes específicos e de alto custo. Enquanto que, na presente Tese, utilizou-se extração simples para remover a água e a cristalização foi conduzida apenas por evaporação do solvente orgânico.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

O esforço empregado nesta Tese visou estabelecer o processo completo da purificação integrado à produção do tacrolimo. Como resultado houve a purificação do fármaco com alto teor de pureza ($\geq 98\%$) na forma de cristal.

Três diferentes caldos fermentados foram produzidos para se estudar a purificação. Maltose e glicose foram utilizadas como fonte de carbono para a *Streptomyces tsukubaensis* produzir o tacrolimo, sendo que junto ao primeiro açúcar foi adicionado ácido picolínico. O terceiro caldo foi produzido utilizando óleo de castanha-do-brasil. A produção específica do tacrolimo com glicose ($2,85 \text{ mg/L} \pm 0,05$) foi inferior à produção utilizando o óleo de castanha-do-brasil ($5,29 \text{ mg/L} \pm 0,06$), e a maltose ($5,19 \text{ mg/L} \pm 0,05$). A fermentação com o óleo de castanha-do-brasil, ainda não registrado na literatura, se destacou pela produtividade específica.

Para isolar o tacrolimo foi desenvolvida a etapa de pré-purificação e a purificação. A pré-purificação foi capaz de retirar 97% dos açúcares redutores e proteínas totais dos caldos fermentados com glicose e maltose. Na fermentação com o óleo de castanha-do-brasil ambas as reduções foram de 90%. O volume do caldo foi reduzido para 1% do volume inicial, enquanto que a perda mássica de tacrolimo dos 3 caldos foi de aproximadamente 25%. Nesta etapa, foram utilizadas evaporações e extrações líquido-líquido.

Na purificação utilizaram-se técnicas mais refinadas para isolar totalmente o tacrolimo com alto rendimento. Estabeleceram-se dois sistemas cromatográficos para a purificação do fármaco. A coluna NH_2 , primeiro sistema cromatográfico, foi operada com fase móvel constituída por acetonitrila e água. Constatou-se que a proporção de acetonitrila usada, na fase móvel, pode ser entre 60 a 100% em conjunto com a água, mas recomenda-se a utilização de 95% de acetonitrila na fase móvel.

O segundo sistema cromatográfico foi constituído pela coluna C18. Empregou-se a temperatura de 60 °C, e fase móvel de acetonitrila e água na relação volumétrica 60/40. Tanto a temperatura, quanto a relação volumétrica da fase móvel são bastante flexíveis.

O sistema cromatográfico foi capaz de purificar o tacrolimo com pureza superior a 99%. No entanto, o produto teve de ser cristalizado para não sofrer reação de epimerização, na qual tacrolimo é convertido tacrolimo diol e o tacrolimo C-10. O tacrolimo cristalizado apresentou pureza em área cromatográfica de 98%, sendo os epímeros responsáveis pelos outros 2%. Realizou-se a DSC dos cristais de tacrolimo obtido.

Por fim, o processo desenvolvido ao longo desta Tese obteve como produto final a patente N° BR 10 2018 014834 6 intitulada de “PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE TACROLIMO”. A invenção refere-se a um processo de purificação de tacrolimo com 100% de pureza, incluindo-se 2% devido aos tautômeros I e II do tacrolimo, em área cromatográfica.

CAPÍTULO 6

6. TRABALHOS FUTUROS

6.1 FERMENTAÇÃO

Para sugestões de trabalhos futuros recomenda-se o estudo da produção de tacrolimo atrelado à recuperação do fármaco, que utilize diferentes fontes de carbono complexas como, por exemplo, óleos vegetais, água de maceração de milho ou rejeito industrial de laticínio.

Em especial para a fermentação, a gama de óleos vegetais é bem vasta no Brasil e há muito a ser explorado como, por exemplo, os óleos de abacate, algodão, amendoim, coco, canola/colza, dendê, girassol, mamona, milho, palma, palmiste, soja, urucum, todos eles ricos em moléculas precursores do tacrolimo. Alguns dos óleos aqui citados ainda não foram reportados pela literatura.

Para o caso da fermentação com óleo de castanha-do-brasil é possível obter o tacrolimo sem a adição de sais e moléculas precursoras do tacrolimo sem que ocorra diminuição da produtividade do fármaco.

6.2 PRÉ-PURIFICAÇÃO

Na etapa de pré-purificação sugere-se realizar o rompimento celular e avaliar o impacto no processo de recuperação do fármaco. O rompimento celular pode ser realizado por diversos métodos como, por exemplo, agitação em moinho de bolas, ultrassom, choque osmótico, adição de detergentes, lise enzimática ou congelamento/descongelamento.

Recomenda-se a caracterização mais apurada do caldo fermentado para cada tipo de fonte de carbono utilizada na biossíntese. Dessa forma, poderia se ter uma ideia das impurezas que estão sendo retiradas e identificar outros coprodutos, ou subprodutos, do tacrolimo gerados pela fermentação.

Na caracterização do caldo podem ser utilizadas técnicas de eletroforese para a identificação de proteínas, ácidos graxos e açúcares. E cromatografia líquida para os coprodutos. O estudo de caracterização do caldo fermentado também se aplica para as fases da mistura heterogênea formada ao longo do processo de pré-purificação. Em relação a mistura heterogênea é possível extrair o tacrolimo residual presente na fase pesada.

Nas operações de extração recomenda-se determinar a cinética do tacrolimo com diferentes solventes. O mesmo se aplica para a eventual utilização de adsorção no processo de purificação. Alguns exemplos de adsorventes são zeólita, carvão ativado e outros adsorventes industriais.

Pode-se ainda utilizar de novas operações unitárias ainda não testadas nesta Tese, como exemplo, a diafiltração e outros métodos de cristalização.

6.3 PURIFICAÇÃO

Na etapa de purificação, as bandas cromatográficas podem ser melhor exploradas. A coluna NH₂ quando utilizada com a fase móvel composta por acetonitrila e água é capaz de reconhecer subprodutos da fermentação como, por exemplo, o ácido picolínico e o ácido nicotínico (Christopherson *et al.*, 2006). Dado a semelhança da estrutura química, é provável que a coluna NH₂ também seja capaz de reconhecer a L-lisina e prolina produzidas na fermentação, ou subprodutos contidos no substrato, como por exemplo, a vitamina B presente no óleo de castanha-do-brasil.

Assim como a coluna NH₂, a coluna C18 operada com acetonitrila e água, é capaz de purificar outros macrolídeos coproduzidos com o tacrolimo. Na literatura foi reportada a produção de ascomicina e meridamicina junto ao fármaco, sendo que a ascomicina é produzida até 20% em relação a massa tacrolimo (Askin *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012, Kosec *et al.*, 2012).

No sistema cromatográfico utilizando a coluna C18 também é possível realizar a purificação do tacrolimo diol e do tacrolimo C10. Os epímeros dos fármacos podem ser novamente convertidos em tacrolimo dado a reversibilidade da reação de epimerização (Namiki *et al.*, 1993; Namiki *et al.*, 1995; Akashi *et al.*, 1996).

Em relação à técnica cromatográfica sugere-se um estudo termodinâmico e de transferência de massa através dos seguintes procedimentos:

- Avaliar a robustez dos sistemas cromatográficos retirando-se etapas da pré-purificação, como por exemplo, o uso da resina DIAION[®] HP-20 ou o uso do acetato de etila.
- Determinar a curva de Van Deemter para cada sistema cromatográfico.
- Obter a dispersão axial através do método do primeiro e segundo momento para cada sistema cromatográfico.
- Calcular a isoterma de adsorção do tacrolimo nas colunas.

Além do estudo termodinâmico e de transferência de massa, é recomendado automatizar o sistema cromatográfica de injeção e coleta.

Por fim, é interessante determinar a curva de solubilidade do tacrolimo nos solventes utilizados nesta Tese e desenvolver novas rotas para a cristalização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBUD FILHO, M.; RAMALHO, H. J. Revisão/Atualização em Transplante Renal: Novos agentes imunossupressores. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 2, n. 19, p. 215-223, 1997.

AKASHI, T.; NEFUJI, T.; YOSHIDA, M.; HOSODA, J. Quantitative determination of tautomeric FK506 by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 3, p. 339-346, 1996.

AL-AMRI, A. M. Long-term follow-up of tacrolimus ointment for treatment of atopic keratoconjunctivitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 157, n. 2, p. 280-286, 2014.

AMAYA, T.; HIROI, J.; LAWRENCE, I. D. Tacrolimus and Other Immunosuppressive. In: ÔMURA, S. **Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice**. Tokyo: Academic Press, 2009. p. 421-452.

ASKIN, D.; REAMER, R. A.; JOE, D.; VOLANTE, R. P.; SHINKAI, I. Synthesis of the novel sarcosine and proline (FK-525) analogs of FK-506: rearrangement of the allylic ester system. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 5448-5450, 1990.

BARREIRO, C.; MARTÍNEZ-CASTRO, M. Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 497-507, 2014.

BARREIRO, C.; PRIETO, C.; SOLA-LANDA, A.; SOLERA, E.; MARTÍNEZ-CASTRO, M.; PÉREZ-REDONDO, R.; GARCÍA-ESTRADA, C.; APARICIO, J. F.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, L. T.; SANTOS-ABERTURAS, J.; SALEHI-NAJAFABADI, Z.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; TAUCH, A.; MARTÍN, J. F. Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 14, p. 3756-3757, 2012.

BERDOULAY, A.; ENGLISH, R. V.; NADELSTEIN, B. Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 4, p. 225-232, 2005.

BÖER, T. M.; PROCÓPIO, J. V. V.; NASCIMENTO DO, T. G.; MACÊDO, R. O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC-MS in the characterization of tacrolimus. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 18-23, 2013.

BOGUSZ, M. J.; AL ENAZI, E.; HASSAN, H.; ABDEL-JAWAAD, J.; AL RUWAILY, J.; AL TUFAIL, M. Simultaneous LC-MS-MS determination of cyclosporine A, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 850, n. 1, p. 471-480, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, C. M. R.; GUERRA JÚNIOR, A. A.; CHERCHIGLIA, M. L.; ANDRADE, E. I. G.; ALMEIDA, A. M.; DA SILVA, G. D.; QUEIROZ, O, V; FALEIROS, D, R; DE ASSIS ACURCIO, F. Gastos do Ministério da Saúde do Brasil com medicamentos de alto custo: uma análise centrada no paciente. **Value in Health**, v. 14, n. 5, p. S71-S77, 2011.

BRASIL. Portaria conjunta nº 5, de 22 de junho de 2017. **Ministério da Saúde**. Disponível em http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/13/MINUTA-de-Portaria_PCDT-Imunossupressao-pos-transplante-hepatico_12_06_2017.pdf>. Acesso em: 23 jun. 17.

BRASIL. Portaria N 2.577 de 27 de outubro de 2006. **Ministério da Saúde**. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt2577_27_10_2006_comp.html>. Acesso em: 23 jun. 17.

BRASIL. Portaria SAS/MS 221 N° 1.318, de 23 de julho de 2002. **Ministério da Saúde**. Disponível em <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/PDF/2014/abril/03/pt-gm-ms-1318-2002.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 17.

BRASIL. Portaria SAS/MS n° 712, de 13 de agosto de 2014. **Ministério da Saúde**. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/agosto/14/IMUNOSSUPRESSAO-TRANSPLANTE-RENAL-MIN-SAS-PCDT-.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 17.

BUCHTA, M.; CVAK, L.; SATKE, J. **Process for Isolation of Macrolide Compounds**. U.S. Patent Application n. 11/662,234, 30 out. 2008.

CABRI, W.; PAISSONI, P.; ROLETTO, J.; MORRA, L. **Process for the Purification of Tacrolimus**. U.S. Patent Application n. US 2008/0160586 A1, 24 out. 2008.

CHAUDHARI, N. D.; TALANIKER, H. V.; GUPTA SANJEEV, G. A. Topical tacrolimus: A boon to dermatology. **International Journal Biomedical Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 188-192, 2012.

CHEN, D.; ZHANG, Q.; ZHANG, Q.; CEN, P.; XU, Z.; LIU, W. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5093-5103, 2012.

CHOI, B. T.; HAM, Y. B.; YU, S. S.; JEONG, K. I.; KIM, B. S. **Method for Refining of High Purity of Tacrolimus**. U.S. Patent n. 8,362,238, 29 jan. 2013.

CHRISTOPHERSON, M. J.; YODER, K., J.; HILL, J. T. Hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC)/ion exchange separation of picolinic and nicotinic acids. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 17, p. 2545-2558, 2006.

CHUNHIENG, T., PÉTRITIS, K., ELFAKIR, C., BROCHIER, J., GOLI, T., & MONTET, D. Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4318-4322, 2004.

COLLINS, C. H. Princípios Básicos de Cromatografia. In COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006.

CONITEC – COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA NO SUS. Everolimo, sirolimo e tacrolimo para imunossupressão em transplante cardíaco. **Relatório de Recomendação**, São Paulo, n. 175, set. de 2015a. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Imunossupressores_TransplanteCardiaco_final.pdf>. Acesso em: 23 jun. 17.

CONITEC – COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA NO SUS. Uso de imunossupressores (everolimo, sirolimo e tacrolimo) em transplantes pulmonares. **Relatório de Recomendação**, São Paulo, n. 200, jan. de 2016a. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2016/Relatorio_Everolimo-Sirolimo-Tacrolimo_final.pdf>. Acesso em: 23 jun. 17.

CONITEC – COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA NO SUS. Everolimo para imunossupressão em transplante hepático em adultos **Relatório de Recomendação**, São Paulo, n. 174, set. de 2015b. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Everolimo_TransplanteHepatico-Adultos_final.pdf>. Acesso em: 23 jun. 17.

CONITEC – COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA NO SUS. Imunossupressores pós-transplante de pâncreas. **Relatório de Recomendação**, São Paulo, out. de 2016c. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2016/Relatorio_Imunossupressao_TransplantePancreas_CP2016.pdf>. Acesso em: 23 jun. 17.

CONITEC – COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIA NO SUS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Imunossupressão no Transplante Hepático em Adultos. . **Relatório de Recomendação**, São Paulo, n. 236, out. de 2016b. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2017/Relatorio_PCDT_Imunossupressao_PosTransplanteHepatico_Adultos_Recomendacao.pdf>. Acesso em: 23 jun. 17.

COSTA, D. C.; CASTRO, R. S. D.; CAMARGO, M. S. F. D.; KARA-JOSÉ, N. Rejeição de transplantes de córnea: tratamento tópico vs. pulsoterapia-resultados de 10 anos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2008.

COX, G. Preparative separations. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3th Ed. 2010, p. 725-755.

CVAK, L.; BUCHTA, M.; JEGOROV, A.; BLATNY, P.; KERI, V.; CSORVASI, A.; SIMON, A.; MAKO, G. **Process for Purifying Tacrolimus**. U.S. Patent Application n. 20,080,000,834, 15 mar. 2008.

DANG, L.; LIU, J.; WANG, C.; LIU, H.; WEN, J. Enhancement of rapamycin production by metabolic engineering in *Streptomyces hygroscopicus* based on genome-scale metabolic model. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 259-270, 2017.

DHALIWAL, J. S., MASON, B. F.; KAUFMAN, S. C. Long-term use of topical tacrolimus (FK506) in high-risk penetrating keratoplasty. **Cornea**, v. 27, n. 4, p. 488-493, 2008.

DSMZ MICROORGANISMS. GYM *Streptomyces* MEDIUM. Alemanha. Disponível em https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium65.pdf>. Acesso em: 12 set 2017.

DUTTA, S.; BASAK, B.; BHUNIA, B.; SINHA, A.; DEY, A. Approaches towards the enhanced production of Rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus* MTCC 4003 through mutagenesis and optimization of process parameters by Taguchi orthogonal array methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 90, 2017.

FERRABOSCHI, P.; COLOMBO, D.; DE MIERI, M.; GRISENTI, P. Evaluation, synthesis and characterization of tacrolimus impurities. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 7, p. 349, 2012.

FERRARI, W. M C. S. **Estudo Termodinâmico Da Separação Do Ibuprofeno Racêmico Por Cromatografia Líquida Quiral Utilizando A Fase Estacionária Tris (3,5-Dimetilfenilcarbamato) De Celulose**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2014. p. 110. Dissertação (Mestrado).

FIOCRUZ. Fiocruz assina contrato para produção de medicamento. **Portal Fiocruz**. Rio de Janeiro, 13 ago. de 2010. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/node/3724>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

FIOCRUZ. Parceria permite distribuição de Tacrolimo. **Portal Fiocruz**. Rio de Janeiro, 20 mar. de 2012. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/node/4821>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

GARCIA, S. C.; LOPES, L. S dos.; SCHOTT, K. L.; BECK, S. T.; POMBLUM, V. J. Cyclosporine A and tacrolimus: a review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393-401, 2004.

GARCIA, V. D.; PACHECO, L. (Exp). Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: janeiro/setembro – 2017. **Registro Brasileiro de Transplantes**, São Paulo, Ano 13, n. 4, 2017b. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbttrim3-leitura.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 17.

GARCIA, V. D.; PACHECO, L. (Exp). Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2009-2016). **Registro Brasileiro de Transplantes**, São Paulo, Ano 12, n. 4, 2017a. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2016/RBT2016-leitura.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 17.

GARCIA, V. D.; PACHECO, L. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2006-2013). **Registro Brasileiro de Transplantes**, São Paulo, Ano 9, n. 4, 2014. Disponível em: [http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2013/rbt2013-parcial\(1\).pdf](http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2013/rbt2013-parcial(1).pdf). Acesso em: 23 jun. 17.

GORANOVIČ, D.; BLAŽIČ, M.; MAGDEVSKA, V.; HORVAT, J.; KUŠČER, E.; POLAK, T.; SANTOS-ABERTURAS, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, M.; BARREIRO, C.; MRAK, P.; KOPITAR, G.; KOSEC, G.; FUJS, S.; MARTÍN, J. F.; PETKOVIĆ, H. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 238, 2012.

GORANOVIČ, D.; KOSEC, G.; MRAK, P.; FUJS, Š.; HORVAT, J.; KUŠČER, E.; KOPITA, G.; PETKOVIĆ, H. Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14292-14300, 2010.

GU, R. L.; SIH, C. J. Synthesis of the C10-C34 segment of the immunosuppressant FK506. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 23, p. 3287-3290, 1990.

GUERRA JÚNIOR, A. A. **Avaliação de custo-efetividade entre esquemas imunossupressores utilizados no transplante renal – um estudo farmacoepidemiológico e farmaco econômico sobre o Programa Nacional de Medicamentos Excepcionais no SUS de 2000 a 2004**. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. p. 143. Tese (Doutorado).

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUIOCHON, G; FELINGER, A; SHIRAZI, D. G. **Fundamentals of Preparative And Nonlinear Chromatography**. New York: Elsevier, 2006.

HANE, K.; FUJIOKA, M.; NAMIKI, Y.; KITAGAWA, T.; KIHARA, N.; SHIMATANI, K.; YASUDA, T. Physico-chemical properties of FK-506. **Iyakuhin Kenkyu**, v. 23, p. 33-43, 1992.

HATANAKA, Y. Q2/fy2017 financial results: ended September 30, 2017. **Relatório Anual Astellas Pharma Inc**. Disponível em <<https://www.astellas.com/en/investors/ir-library>>. Acesso em: 12 set 2017.

HIGAKI, T. *et al.* **Method for Separating Lactone-Containing High-Molecular Weight Compounds**. U.S. Patent n. 6,576,135, 10 jun. 2003.

HUANG, D.; XIA, M.; LI, S.; WEN, J.; JIA, X. Enhancement of FK506 production by engineering secondary pathways of *Streptomyces tsukubaensis* and exogenous feeding strategies. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 9, p. 1023-1037, 2013.

INNES, C. M. J.; ALLAN, E. J. Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 301-308, 2001.

IRELAND, R. E.; GLEASON, J. L.; GEGNAS, L. D.; HIGHSMITH, T. K. A Total Synthesis of FK506. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 6856-6872, 1996.

IRELAND, R.; LIU, L.; ROPER, T. D. Total synthesis of FK-506. Part 1: Construction of the C16–C34 fragment. **Tetrahedron**, v. 53, n. 39, p. 13221-13256, 1997a.

IRELAND, R.; LIU, L.; ROPER, T. D. Total synthesis of FK-506. Part 2: Completion of the synthesis. **Tetrahedron**, v. 53, n. 39, p. 13257-13284, 1997b.

JOE, J. H.; LEE, W. M.; PARK, Y. J.; JOE, K. H.; OH, D. H.; SEO, Y. G.; SEO, Y. G.; WOO, J. S.; YONG, C. S.; CHOI, H. G. Effect of the solid-dispersion method on the solubility and crystalline property of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1, p. 161-166, 2010.

JONES, T. K.; MILLS, S. G.; REAMER, R. A.; ASKIN, D.; DESMOND, R.; VOLANTE, R. P.; SHINKAI, I. J. Chemistry of tricarboxyl hemiketals and application of Evans technology to the total synthesis of the immunosuppressant (-)-FK-506. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 8, p. 2998-3017, 1990.

JUNG, S.; LEE, K.; PARK, Y.-J.; YOON, S.; YOO, Y. J. Process development for purifying tacrolimus from *Streptomyces* sp. using adsorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 6, p. 1208-1213, 2011.

JUNG, S.; MOON, S.; LEE, K.; PARK, Y.-J.; YOON, S.; YOO, Y. J. Strain development of *Streptomyces* sp. for tacrolimus production using sequential adaptation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1467, 2009.

KERI, V.; CSORVASI, A.; MELCZER, I.; SIMON, A. **Method of Purifying Tacrolimus**. U.S. Patent Application n. 20,060,142,565, 22 dez. 2005.

KIM, H. S.; PARK, Y. I. Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1638, 2007.

KINO, T.; HATANAKA, H.; HASHIMOTO, M.; NISHIYAMA, M.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces* – I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1249-1255, 1987a.

KINO, T.; HATANAKA, H.; MIYATA, S.; INAMURA, N.; MISHIYAMA M.; YAJIMA, T.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces* – II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1256-1265, 1987b.

KODAVANTI, P. R.; ROYLAND, J. E.; MOORE-SMITH, D. A.; BESAS, J.; RICHARDS, J. E.; BEASLEY, T. E.; EVANSKY, T. ; BUSHNELL, P. J. Acute and subchronic toxicity of inhaled toluene in male Long–Evans rats: oxidative stress markers in brain. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 10-19, 2015.

KOSEC, G.; GORANOVIĆ, D.; MRAK, P.; FUJS, Š.; KUŠČER, E.; HORVAT, J.; KOPITAR, G.; PETKOVIĆ, H. Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 1, p. 39-46, 2012.

KUMAR, P.; SHARMA, S.; SHUKLA, A.; KUMAR, S.; MAURYA, R.; KATIAL, V.; MITRA, A.; GIGRAS, P. **Production of tacrolimus (FK-506) using new *Streptomyces species***. U.S. Patent Application n. 10/575,444, 16 ago. 2007.

LABCHAROENWONGS, P.; JIRAPONGSANANURUK, O.; VISITSUNTHORN, N.; KOSRIRUKVONGS, P.; SAENGIN, P.; VICHYANOND, P. A double-masked comparison of 0.1% tacrolimus ointment and 2% cyclosporine eye drops in the treatment of vernal keratoconjunctivitis in children. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 30, n. 3, p. 177, 2012.

LÄMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, n. 6, p. 814–856, 2010.

LHOËST, G.; VERBEECK, R. K.; MATON, N.; MUTHELET, P.; LATINNE, D. The *in vitro* immunosuppressive activity of the C15-demethylated metabolite of FK-506 is governed by ring-and open-chain tautomerism effects. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 2, p. 622-626, 1995.

LIN, A. N. Topical calcineurin inhibitors. In: WOLVERTON, S. E. **Comprehensive dermatologic drug therapy**. 3th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012.

LIU L., ZHANG J., YUAN J., DANG Y., YANG C., CHEN X., XU J., YU L. Characterization of a human regulatory subunit of protein phosphatase 3 gene (PPP3RL) expressed specifically in testis. **Molecular Biology Reports**, v. 32, n. 1, p. 41-45, 2005.

LUCILIUS, C.; ROQUE, C. HC da Unicamp bate recorde de transplantes em 2016. **Assessoria de Imprensa do HC Unicamp**, Campinas 15 mar. de 2017. Disponível em: <<https://www.hc.unicamp.br/node/1059>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

LUZ, T. C. B.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S.; MAGARINOS-TORRES, C; WETTERMARK, B. Trends in medicines procurement by the Brazilian federal government from 2006 to 2013. **PloS one**, v. 12, n. 4, p., 2017.

MACIEL, V. Ministério da Saúde garante abastecimento de imunossupressores aos estados. **Portal Principal de Notícias da Saúde - Ministério da Saúde**, Mato Grosso do Sul, 08 de dez. de 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42156-ministerio-da-saude-garante-abastecimento-de-imunossupressores-aos-estados>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MAGALHÃES, O. A. **Prevenção de Rejeição Em Transplantes de Córnea de Alto Risco com Tacrolimo 0,03% Colírio**. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. p. 50. Dissertação (Mestardo).

MAIA, K. Pesquisa analisa gastos com medicamentos no Brasil. **Fiocruz Minas**. Minas Gerais, 19 jun. de 2017. Disponível em: <<http://www.cosemsrj.org.br/pesquisa-analisa-gastos-com-medicamentos-no-brasil>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MALDONADE, I. R.; DE CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. **Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2013.

MARTÍNEZ-CASTRO, M.; BARREIRO, C.; ROMERO, F.; FERNÁNDEZCHIMENO, R. I.; MARTÍN, J. F. *Streptomyces tacrolimicus* sp. nov., a low producer of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1084-1088, 2011.

MARTÍNEZ-CASTRO, M.; SALEHI-NAJAFABADI, Z.; ROMERO, F.; PÉREZSANCHIZ, R.; FERNÁNDEZ-CHIMENO, R. I.; MARTÍN, J. F.; BARREIRO, C. Taxonomy and chemically semi-defined media for the analysis of the tacrolimus producer '*Streptomyces tsukubaensis*'. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2139-2152, 2013.

MARTÍNEZ-CASTRO, M.; SOLERA, E.; MARTÍN, J. F.; BARREIRO, C. Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp. ATCC 55098. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 2, p. 150-154, 2009.

MARTINS, F. **Tacrolimus na Oftalmologia**. 03 de mai. de 2016. Disponível em: <<https://www.fabiolamartins.com/single-post/2016/05/03/Tacrolimus-na-Oftalmologia>>. Acesso em: 30 de mar. de 2018.

MATOS, A. Farmanguinhos inicia obras na área de produção. **Portal Fiocruz**. Rio de Janeiro, 02 jul. de 2017. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/farmanguinhos-inicia-obras-na-area-de-producao>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5th Ed. St. Gallen: John Wiley & Sons, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Departamento Instrução Normativa nº 24: **Anexo II - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Resíduos E Contaminantes - Pncrc Animal**. Diário Oficial da União, Brasília. Seção 7, páginas 9 a 12, 2009.

MISHRA, A.; VERMA, S. Optimization of process parameters for tacrolimus (FK 506) production by new isolate of *Streptomyces* sp. using response surface methodology (RSM). **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 4, p. 419-425, 2012.

MO, S.; BAN, Y. H.; PARK, J. W.; YOO, Y. J.; YOON, Y. J. Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1473-1482, 2009.

MOREIRA, J. M. **Produção de Tacrolimo via Fermentação por *Streptomyces tsukubaensis***. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2018. p. 124. Tese (Doutorado).

MOTAMEDI, H.; SHAFIEE, A. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 3, p. 528-534, 1998.

MOTAMEDI, H.; SHAFIEE, A.; CAI, S.-J.; STREICHER, S. L.; ARISON, B. H.; MILLER, R. R. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 17, p. 5243-5248, 1996.

MÜLLER, C. H.; FIGUEIREDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U. de; STEIN, R. L. B.; SILVA, A. de B. **A Cultura Da Castanha-Do-Brasil**. São Paulo: Textonovo Editora e Serviço Editoriais Ltda. 1995, p 55-57.

NAKATSUKA, M.; RAGAN, J. A.; SAMMAKIA, T.; SMITH, D. B.; UEHLING, D. E.; SCHREIBER, S. L. Total synthesis of FK506 and an FKBP probe reagent, [C (8), C (9)-13C2]-FK506. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 14, p. 5583-5601, 1990.

NAMIKI, Y.; FUJIWARA, A.; KIHARA, N.; KODA, S.; HANE, K.; YASUDA, T. Determination of the immunosuppressive drug tacrolimus in its dosage forms by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 40, n. 5-6, p. 253-258, 1995.

NAMIKI, Y.; KIHARA, N.; KODA, S.; HANE, K.; YASUDA, T. Tautomeric phenomenon of a novel potent immunosuppressant (FK506) in solution. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, n. 7, p. 1149-1155, 1993.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biologic Chemistry**, Bethesda, Md, v. 153, n. 2, p. 375-380, 1960.

NISHIHARA, Y.; HONDA, K.; MUKAI, K.; HASHIMOTO, N.; HATANAKA, H.; YAMASHITA, M. **Method for Separating Analogous Organic Compounds**. U.S. Patent n. 6,492,513, 10 dez. 2002.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; TENFEN, S. Z. A.; KLABUNDE, G. H. F. FIT 5806 – **Biociências**. Santa Catarina: **Centro de Ciências Agrárias**, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016. p. 111 (APOSTILA). Disponível em: <<http://lfdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Biotecnologia-Genetica-molecular-2016.pdf>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2018.

OKUHARA, M.; TANAKA, H.; GOTO, T.; KINO, T.; HATANAKA, H. **Method for Immunosuppression**. U.S. Patent n. 4,929,611, 29 maio 1990.

OLIVEIRA, N. I. D.; HARADA, K. M.; SPINELLI, G. A.; PARK, S. I.; SAMPAIO, E. L. M.; FELIPE, C. R.; SILVA JÚNIOR, H. T.; PESTANA, J. O. M. Eficácia, tolerabilidade e

segurança do uso do sirolimo após o transplante renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 31, n. 4, p. 258-268, 2009.

OLSEN, B. A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1, p. 113-122, 2001.

PAIER C. R. L. **Caracterização estrutural do complexo protéico Calsarcina 1 : Calcineurina A**. São Paulo: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2014. p. 229 Tese (Doutorado).

PAIVA, V. Hospital de Clínicas da Unicamp bate recorde de transplantes. **Assessoria de Imprensa do HC Unicamp**, Campinas 11 jan. de 2018. Disponível em: <<https://www.unicamp.br/unicamp/noticias/2018/01/11/hospital-de-clinicas-da-unicamp-bate-recorde-de-transplantes>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

PARK, J. W.; MO, S-J.; PARK, S. R.; BAN, Y-H.; YOO, Y. J.; YOON, Y. J. Physicochemical characterization of tacrolimus-loaded solid dispersion with sodium carboxymethyl cellulose and sodium lauryl sulfate. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 6, p. 893-898, 2009.

PATIL, N. S.; MENDHE, R.; KHEDKAR, A. P.; MELARKODE, R.; GURURAJA, R. **Process for the Purification of Macrolides**. U.S. Patent n. 7,473,366, 6 jan. 2009.

PETERKA, T. R.; HREN, J.; BASTARDA, A., BERGLES, J.; URLEB, U. Solid state compatibility study and characterization of a novel degradation product of tacrolimus in formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 110, p. 67-75, 2015.

POZZOBON, A.; DAMETTO, A.; SCHORR-LENZ, A. M.; GRANADA, C. E.; STEIN, C.; BLASI, E. A. R.; DIEFENTHALER, F. O.; BUFFON, G.; BERTUZZI, G. P.; BUSTAMANTE FILHO, I. C.; GUIMARÃES, J. A.; GENRO, J. P.; WOLLINGER, L. M.;

SANTI, L.; GOETTERT, M. I.; OLIVEIRA, M. B.; SEIBEL, P. M.; SPEROTTO, R. A.; DA SILVA, R. Z.; DORNELLES, T. F.; CONTINI, V.; WALDOW, V. A.; DA SILVA, W. O. B. Extração e quantificação de ácidos nucleicos e proteínas. In: SPEROTTO, R. A. **Protocolos e Métodos de Análise em Laboratórios de Biotecnologia Agroalimentar e de Saúde Humana**. Lajeado: Univates, 2014. p. 85-86.

RAMOS, A. M.. **Separação de Piperonal Contido em uma Solução de Síntese a Partir do Óleo Essencial de *piper hispidinervum* c. Dc por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Injeção Empilhada**. São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2014. p. 104 Tese (Doutorado).

REICHENSPURNER, H. Overview of tacrolimus-based immunosuppression after heart or lung transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 24, n. 2, p. 119-130, 2005.

RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. New York: John Wiley & Sons, 1984.

SANDRIN, L. D. N. A.; SANTO, R. M. Perspectivas no tratamento da alergia ocular: revisão das principais estratégias terapêuticas. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 74, n. 5, p. 319-324, 2015.

SCHULTE, M; JÖHNCK. M; SKUDAS, R.; UNGER K. K.; VON HOHENESCHE, C. F.; WEWERS, W; DINGENEN, J.; KINKEL, J. Stationary Phases and Chromatographic Systems. In In SCHMIDT-TRAUB, H; SCHULTE, M.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.. **Preparative Chromatography**. 2nd Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012. p. 47–198.

SEIDEL-MORGENSTERN, A; SCHULTE, M; EPPING, A. Fundamentals and General Terminology. In SCHMIDT-TRAUB, H; SCHULTE, M.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.. **Preparative Chromatography**. 2nd Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012. p. 7-46.

SHAFIEE, A.; MOTAMEDI, H.; CHEN, T. Enzymology of FK-506 biosynthesis: Purification and characterization of 31-O-desmethylFK-506 O: methyltransferase from *Streptomyces* sp. MA6858. **European Journal of Biochemistry**, v. 225, n. 2, p. 755-764, 1994.

SINGH, B. P.; BEHERA, B. K. Regulation of tacrolimus production by altering primary source of carbons and amino acids. **Letters in applied microbiology**, v. 49, n. 2, p. 254-259, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2nd Ed., New York: Wiley-Interscience, 1979.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3th Ed., Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19-23, 1952.

SUN, Y.; YE, R. Impact of a novel precursor on FK506 production and key gene transcription in *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 4, p. 3351-3358, 2016.

SUN, Y; YE, R. Impact of a novel precursor on FK506 production and key gene transcription in *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. **Research on Chemical Intermediates**, v. 42, n. 4, p. 3351-3358, 2016.

TANAKA, H.; KURODA, A.; MARUSAWA, H.; HATANAKA, H.; KINO, T.;GOTO, T.; HASHIMOTO, M. Structure of FK506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 16, p. 5031-5033, 1987.

TURŁO, J.; GAJZLERSKA, W.; KLIMASZEWSKA, M.; KRÓL, M.; DAWIDOWSKI, M.; GUTKOWSKA, B. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 6, p. 388-395, 2012.

UNGER, K. K.; WEBER, E. **A guide to practical HPLC**. Darmstadt: GIT-Verlag, 1999.

VAID, S. **Process for Producing Tacrolimus (FK-506) Using Vegetable Oil as Sole Source of Carbon**. U.S. Patent Application n. 11/698,881, 29 jan. 2007.

WALLEMACQ, P. E.; REDING, R. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2219-2228, 1993.

WANG, J.; LIU, H.; HUANG, D.; JIN, L.; WANG, C.; WEN, J. Comparative proteomic and metabolomic analysis of *Streptomyces tsukubaensis* reveals the metabolic mechanism of FK506 overproduction by feeding soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2447-2465, 2017.

WATANABE, A. S. Conhecendo outros usos do inibidor de calcineurina. **Revista Brasileira Medicina**, v. 72, n. especial G1, p. 13-16, 2015.

WEBSTER, A. C.; LEE, V. W.; CHAPMAN, J. R.; CRAIG, J. C. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Transplantation**, v. 81, n. 9, p. 1234-1248, 2006.

XIA, M.; HUANG, D.; LI, S.; WEN, J.; JIA, X.; CHEN, Y. Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 10, p. 2717-2730, 2013.

YAMASHITA, K.; NAKATE, T.; OKIMOTO, K.; OHIKE, A.; TOKUNAGA, Y.; IBUKI, R.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 267, n. 1, p. 79-91, 2003.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZIDAN, A. S.; RAHMAN, Z.; SAYEED, V.; RAW, A.; YU, L.; KHAN, M. A. Crystallinity evaluation of tacrolimus solid dispersions by chemometric analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 341-350, 2012.

APÊNDICES

Apêndice A: Porosidade total e fração de vazios da coluna C18

A coluna C18 foi empacotada a seco no Laboratório de Processo de Transferência de Massa (LPTM) com a sílica Vydac[®] 150HC Media Specs. O fornecedor da sílica, Grace Materials Technologies, cedeu as informações da Tabela A.1.

Tabela A.1 – Características da sílica C18 fornecida pela Grace Materials Technologies.

Propriedades	Valores
Tamanho de poro (Å)	150
Volume de poro (mL/g)	1,05
Área superficial (m²/g)	320
Diâmetro de partícula (µm)	20
Recobrimento (%)	16
Porosidade da partícula (ϵ_p)	0,357

As dimensões da coluna utilizada para o empacotamento encontram-se na Tabela A.2.

Tabela A.2 – Dimensões da coluna C18.

Coluna	Valores
Diâmetro da coluna - d_C (cm)	1,00
Área da seção transversal (cm²)	0,785
Comprimento do leito - L (cm)	25,00

A porosidade total (ϵ_T) da coluna semipreparativa C18 foi determinada através do método dos momentos de acordo com a Equação 2.8. O composto inerte utilizado para a determinação da porosidade total foi o uracil e a fase móvel foi composta de acetonitrila e

água na proporção volumétrica 60/40. A Figura A.1 apresenta a relação linear dos dados experimentais para a determinação da porosidade total.

O coeficiente angular forneceu a valor de 0,643 para porosidade total. O coeficiente de correlação da reta resultou em 0,999.

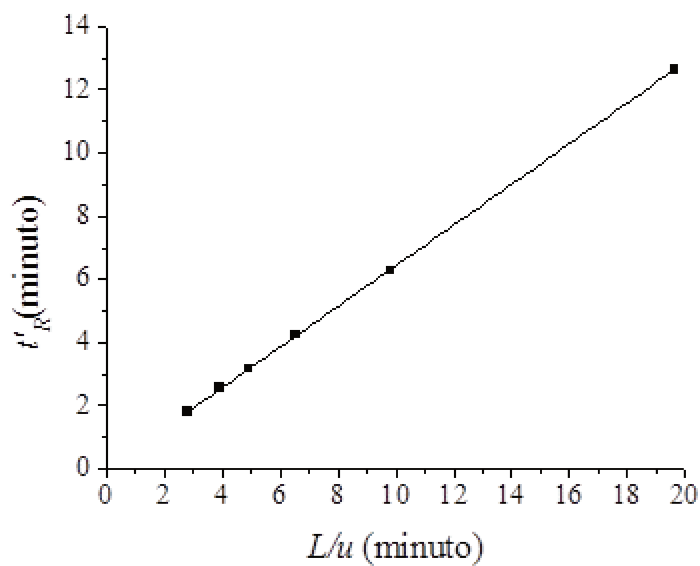


Figura A.1 – Porosidade total da coluna semipreparativa C18.

Por meio da Equação 2.7 determinou-se a fração de vazios do leito (ε) utilizando a porosidade total e a porosidade da partícula. O valor obtido para ε foi de 0,446.

Apêndice B: Porosidade total e fração de vazios da Coluna NH₂

A coluna NH₂ foi empacotada a seco no Laboratório de Processo de Transferência de Massa (LPTM) com a sílica Luna NH₂ Phenomenex[®] com diâmetro de partícula 10 µm. As dimensões da coluna utilizada para o empacotamento encontram-se na Tabela B.1.

Tabela B.1 – Dimensões da coluna NH₂.

Coluna	Valores
Diâmetro da coluna - d_C (cm)	1,00
Área da seção transversal (cm ²)	0,785
Comprimento do leito - L (cm)	10,00

A porosidade total e a fração de vazios da coluna semipreparativa NH₂ foram determinadas experimentalmente com 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB) e azul de dextrana, respectivamente, através da Equação 2.8.

A Figura B.1 apresenta a relação linear para a determinação da porosidade total. Os valores obtidos para a porosidade total (ε_T) e fração de vazios (ε) foram 0,546 (R^2 de 0,999) e 0,434 (R^2 de 0,999). A porosidade da partícula (ε_p) foi determinada pela Equação 2.7 e resultou no valor de 0,199.

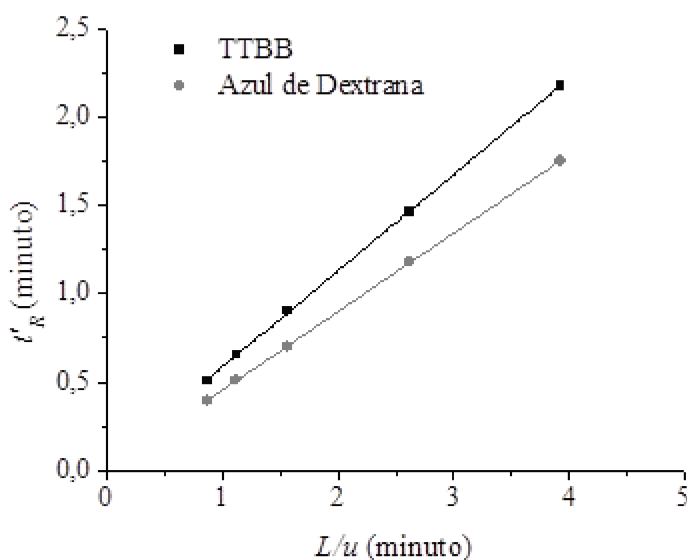


Figura B.1 – Porosidade total e fração de vazios da coluna semipreparativa NH₂.

Apêndice C: Método de quantificação do tacrolimo

A elaboração do método quantitativo baseou-se nos dados da literatura resumidos na Tabela 2.3. O caldo fermentado, por ser a amostra mais complexa, foi definido como a amostra alvo. O procedimento de quantificação do tacrolimo foi descrito em “3.5.2 Quantificação de tacrolimo”.

O procedimento do preparo da amostra do caldo fermentado envolveu coletar uma amostra do caldo fermentado, extraí-la com acetona e concentrá-la por evaporação até se obter um material viscoso e escuro.

O material viscoso foi solubilizado em solução aquosa de acetonitrila a 70%. Posteriormente, a solução aquosa de acetonitrila foi utilizada como fase móvel. Com a diluição houve a formação de uma mistura bifásica, em que a fase menos densa, formada por acetonitrila, era rica em tacrolimo. A fase mais densa, composta por água, apresentou concentração do fármaco abaixo da ordem de micrograma.

Observou-se que a proporção volumétrica entre as fases formadas era a mesma entre a proporção da solução de acetonitrila e água usada para a diluição. A mistura bifásica foi separada após 2 horas em temperaturas de 4 °C por decantação. A quantificação do tacrolimo em HPLC foi realizada com a fase menos densa. As condições cromatográficas foram fase móvel de acetonitrila e água na proporção volumétrica 70/30, temperatura de 60 °C e *loop* de 20 µm. A coluna Luna[®] C18 foi utilizada para a quantificação.

Na figura C.1 são apresentados os cromatogramas do padrão de tacrolimo e da amostra de caldo com 96 horas de fermentação. Uma reta foi traçada entre os gráficos para identificar o tempo de retenção do tacrolimo nos cromatogramas.

Akashi *et al.* (1996) reportaram que temperatura, pH e água influenciam na cinética de reação do tacrolimo nos epímeros diol (tautômeros I) e C-10 (tautômeros II). Após o estudo se constatou que a reação não é instantânea e estabiliza em 92% em termo de área cromatográfica após 2 horas (Namiki *et al.*, 1995).

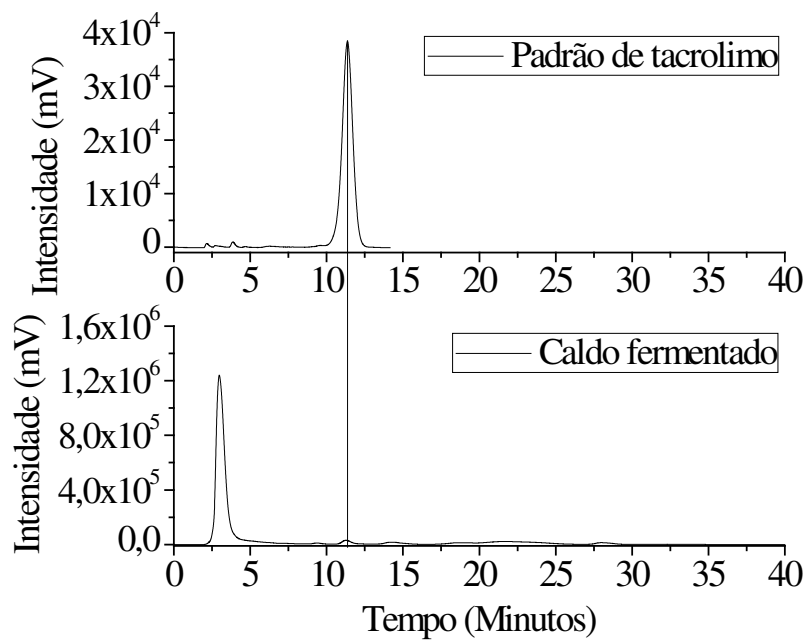


Figura C.1 – Padrão do tacrolimo e amostra da fermentação de *S. tsukubaensis* para a produção de tacrolimo.