



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química (FEQ)

SÉFORAH CAROLINA MARQUES SILVA

USO DE ÓLEOS VEGETAIS COMO FONTE DE CARBONO NA  
FERMENTAÇÃO DA *Streptomyces tsukubaensis* VISANDO O AUMENTO  
DA PRODUÇÃO DE TACROLIMO

CAMPINAS

2019

SÉFORAH CAROLINA MARQUES SILVA

USO DE ÓLEOS VEGETAIS COMO FONTE DE CARBONO NA  
FERMENTAÇÃO DA *Streptomyces tsukubaensis* VISANDO O AUMENTO  
DA PRODUÇÃO DE TACROLIMO

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

Orientador: Professor Doutor Marco Aurélio  
Cremasco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA SÉFORAH CAROLINA MARQUES  
SILVA E ORIENTADA PELO PROFESSOR  
DOUTOR MARCO AURÉLIO CREMASCO.

CAMPINAS

2019

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

Si38u Silva, Séforah Carolina Marques, 1993-  
    Uso de óleos vegetais como fonte de carbono na fermentação da  
    Streptomyces tsukubaensis visando o aumento da produção de tacrolimo /  
    Séforah Carolina Marques Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

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

    1. Tacrolimo. 2. Óleos vegetais. 3. Fermentação. 4. Streptomyces. I.  
    Cremasco, Marco Aurélio, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
    Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Use of vegetable oils as a carbon source in the fermentation of Streptomyces tsukubaensis in order to increase the production of tacrolimus

**Palavras-chave em inglês:**

Tacrolimus

Vegetable oils

Fermentation

Streptomyces

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Cremasco [Orientador]

Cremasco, Marco Aurélio

Márcio Caliani

Sônia Maria Alves Bueno

**Data de defesa:** 16-12-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1427-4486>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9674497750402550>

Folha de Aprovação de Defesa de Dissertação defendida por Séforah Carolina Marques Silva e aprovada em 16 de dezembro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Márcio Caliarí

Instituição: Universidade Estadual de Goiás (UFG)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA e na Secretaria de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de deixar meus sinceros agradecimentos a pessoas que direta ou indiretamente, colaboraram para o sucesso desse trabalho. Primeiramente, agradeço a Deus pela força e por ter sido tão generoso com relação às pessoas que Ele colocou na minha vida.

À minha família, em especial à minha avó Avelina, ao meu pai Olinto, à minha tia Jaqueline e ao meu tio Ronan por sempre acreditarem em minha capacidade, serem meu alicerce e entenderem minha ausência durante muitos momentos e me apoiarem incondicionalmente. Nunca chegaria aonde eu cheguei sem a ajuda e o carinho de vocês.

Aos meus amigos, em especial Beatriz, Nil, Letícia, Laís, Túlio, Talles, Nilza e Alexandra, pelo apoio emocional, pelas aventuras vividas, por me motivarem a sempre querer mais e por serem minha família em Campinas. Minha trajetória seria muito mais complicada sem vocês por perto.

Agradeço por todas as oportunidades dadas pelo professor Cremasco e pelo apoio técnico oferecido pela professora Telma e toda equipe do LABBPOR. Aos meus colegas de laboratório Alessandra, Jean, Murilo e Ana por todo aprendizado e companhia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Tough times don't last, tough people do.*

Robert Schuller

## RESUMO

O tacrolimo é um imunossupressor utilizado no tratamento de pacientes que realizaram transplantes de coração, rins ou fígado. Além disso, ele também é utilizado no tratamento de algumas doenças dermatológicas, como psoríase e vitiligo, além de suas aplicações oftalmológicas. Neste trabalho, o óleo de coco, o óleo de castanha-do-Brasil e a glicose foram avaliados como fontes primárias de carbono na fermentação da *Streptomyces tsukubaensis* visando o aumento da produção de tacrolimo. O processo fermentativo foi conduzido em *shaker* durante 168 h, a uma temperatura de 28 °C e rotação de 130 rpm. Os resultados mostraram que as fermentações conduzidas utilizando os óleos vegetais como fontes de carbono obtiveram maiores concentrações de tacrolimo quando comparadas à fermentação utilizando glicose. O óleo de castanha-do-Brasil foi a melhor fonte de carbono entre as opções testadas, uma vez que o mesmo obteve a maior produção de fármaco (41,67 mg/L) e não estimulou o aumento da produção de biomassa. As maiores concentrações de tacrolimo obtidas utilizando óleo de coco e glicose foram iguais a 31,35 e 20,88 mg/L, respectivamente.

**Palavras-chave:** tacrolimo, *Streptomyces*, fermentação, óleos vegetais.

## ABSTRACT

Tacrolimus is a immunosuppressive used in the treatment of patients that had heart, kidney or liver transplanted. Also, it is used in the treatment of some dermatological diseases, such as psoriasis and vitiligo, in addition to having ophtalmological applications. In this work, coconut oil, Brazil nut oil and glucose were evaluated as primary sources of carbon in the *Streptomyces tsukubaensis* fermentation in order to enhance tacrolimus production. The fermentative process was conducted in shaker during 168 h at 28 °C and 130 rpm. The results showed that fermentations conducted using vegetable oils as source of carbon obtained higher tacrolimus concentration than the fermantation using glucose. The Brazil nut oil was the best carbon source tested, since it the highest tacrolimus production (41,67 mg/L) and did not increase the biomass production. The maximum concentration obtained using coconut oil and glucose were 31,35 and 20,88 mg/L, respectively.

**Keywords:** tacrolimus, *Streptomyces*, fermentation, vegetable oils.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura molecular do FK506

Figura 2.2 – Tacrolimo, tacrolimo diol e tacrolimo C10, respectivamente.

Figura 3.1 – Curva de calibração do tacrolimo

Figura 3.2 – Curva de calibração de açúcares redutores

Figura 3.3 – Curva de calibração de proteínas

Figura 4.1 – Produção de tacrolimo ao longo de 168h utilizando fontes distintas de carbono

Figura 4.2 – Biomassa produzida ao longo dos processos fermentativos utilizando diferentes fontes de carbono

Figura 4.3 – Produção específica de tacrolimo ao longo da fermentação

Figura 4.4 – Variação do pH durante as fermentações

Figura 4.5 – Concentração de açúcares redutores ao longo das fermentações utilizando três fontes de carbono distintas

Figura 4.6 – Concentração de proteínas ao longo das fermentações utilizando três fontes de carbono distintas

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Fontes de nitrogênio que interferem na produção de metabólitos secundários

Tabela 2.2 – Antibióticos produzidos por espécies de *Streptomyces* reprimidos por fontes de carbono

Tabela 3.1 – Composição do meio de cultivo em placas de Petri

Tabela 3.2 – Composição do meio utilizado na pré-inoculação e inoculação

Tabela 3.3 – Composição do meio de cultivo

Tabela 3.4 – Reagentes utilizados para a preparação do reagente SN-I

Tabela 3.5 – Reagentes utilizados para a preparação do reagente SN-II

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Contextualização e motivação do trabalho .....	13
1.2. OJETIVO GERAL.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Aspectos gerais e características físico-químicas do tacrolimo.....	16
2.2. Mecanismo de ação e aplicações do tacrolimo .....	17
2.3. Transplantes de órgãos e uso do tacrolimo no Brasil .....	19
2.4. O gênero Streptomyces .....	21
2.5. Biossíntese do tacrolimo .....	21
2.6. Avanços na biossíntese do tacrolimo.....	22
2.7. Regulação pela fonte de nitrogênio .....	23
2.8. Regulação pela fonte de fosfato .....	25
2.9. Regulação pela fonte de carbono .....	25
2.10. Uso de óleos vegetais como fontes de carbono.....	26
2.11. Produção de oleaginosas no Brasil.....	28
2.12. Aspectos gerais dos óleos de coco e de castanha-do-Brasil.....	28
2.13. Métodos de quantificação do tacrolimo .....	29
2.14. Trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa .....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1. Bactéria utilizada .....	33
3.2. Cultivo da bactéria, pré-inoculação, inoculação e fermentação .....	33
3.2.1. Cultivo bacteriano .....	33
3.2.2. Pré-inoculação e inoculação .....	34
3.2.3. Fermentação.....	35
3.3. Preparo das amostras e quantificação do fármaco .....	36
3.4. Quantificação de proteínas e açúcares redutores .....	38
3.4.1. Quantificação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson.....	38
3.4.2. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford .....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1. Avaliação da produção global e específica de tacrolimo.....	42
4.2. Variação do pH ao longo do processo fermentativo.....	47
4.3. Quantificação de açúcares redutores e proteínas .....	49
5. CONCLUSÃO .....	51

5.1. Sugestão para trabalhos futuros .....	52
REFERÊNCIAS .....	53

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Contextualização e motivação do trabalho

O tacrolimo, também conhecido pela sigla FK506, é um fármaco descoberto pela Fujisawa Pharmaceutical em 1984, cujas aplicações vão desde a imunossupressão de órgãos até o tratamento de doenças dermatológicas (BARREIRO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014; ARORA *et al.*, 2019). A produção desse fármaco se dá através da fermentação usando a *Streptomyces tsukubaensis*, uma bactéria encontrada no solo do Monte Tsukuba, Japão. O nome tacrolimo é resultado da seguinte combinação: “*t*” representa o nome Tsukuba, “*acrol*” vem de macrolídeo e o sufixo “*imus*” é devido às aplicações imunossupressoras do mesmo (AMAYA *et al.*, 2003).

A produção de FK506 apresenta dois grandes gargalos que dificultam sua produção em nível industrial: baixa produção de fármaco e complexo processo de purificação (JUNG *et al.*, 2011). Com o intuito de aumentar a produção de tacrolimo, grupos de pesquisa têm utilizado estratégias como a modificação genética da bactéria e a suplementação da fermentação com diferentes substâncias as quais poderiam ser precursoras do FK506 (BARREIRO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014; WANG *et al.*, 2017a; POSHEKHONTSEVA *et al.*, 2019). Além disso, durante a produção do tacrolimo, muitos outros metabólitos secundários análogos são secretados no meio de fermentação, o que dificulta o processo de purificação (JUNG *et al.*, 2011).

Inicialmente, o tacrolimo era utilizado apenas como imunossupressor, chegando a ser até 100 vezes mais potente que a ciclosporina. Contudo, na atualidade as aplicações do mesmo são muitas (AMAYA *et al.*, 2003; ARORA *et al.*, 2019; SIEGL *et al.*, 2019). Em tratamentos imunossupressivos, o FK506 é utilizado após transplante de rins, fígado, coração, pâncreas e

pulmão (KLINTMALN, 1994). Na dermatologia, ele é utilizado nas terapias contra dermatite atópica, líquen plano, vitiligo, alopecia, psoríase e outros (CATHER *et al.*, 2001). Por fim, o FK506 também apresenta aplicações na oftalmologia, sendo utilizado no tratamento de uveíte refratária, síndrome do olho seco e conjuntivite alérgica (MOCHIZUKI *et al.*, 1993; HESSEN e AKPEK, 2014; SHOUGHY *et al.*, 2016).

O Brasil possui o maior sistema público de transplantes de órgãos do mundo, sendo que anualmente são gastos aproximadamente 1 bilhão de reais na manutenção desse programa (COSTA *et al.*, 2014; PESTANA *et al.*, 2011). Segundo relatório publicado pela Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), o número de transplantes realizados tem aumentado, sendo que de janeiro a março de 2019, já haviam sido realizados 2.141 transplantes, sendo a maior parte deles transplantes renais (67,94%).

No Brasil, o tacrolimo é fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sendo utilizado diariamente por mais de 25 mil pessoas. No passado, o fármaco era produzido pela Libbs Farmacêutica, porém, devido a uma transferência de tecnologia ocorrida em 2017, ele é atualmente produzido pelo laboratório Farmanguinhos (Libbs Farmacêutica, 2019).

Ao longo dos anos já foram reportadas várias falhas no abastecimento de tacrolimo pelo Sistema Único de Saúde. Uma reportagem feita pelo Jornal Estadão em novembro de 2017, reporta falta do medicamento em vários estados brasileiros, sendo que no estado de São Paulo foram solicitados 8,6 milhões de comprimidos no último trimestre do ano, porém apenas 6,6 milhões foram entregues. Segundo uma matéria publicada pela Revista Veja em maio de 2018, a distribuição de FK506 ainda estava comprometida, uma vez que apenas 22% da demanda do medicamento havia sido suprida. Em nota publicada pelo Ministério da Saúde em abril de 2019, o abastecimento de FK506 encontrava-se irregular em todo o país, todavia a situação devia se regularizar até o fim daquele mês. No entanto, ainda nos dias de hoje o problema não foi solucionado. Segundo uma matéria publicada em julho de 2019 pelo Jornal Extra Classe, só no estado do Rio Grande do Sul, cerca de 6 mil transplantados ainda sofrem com a incerteza do fornecimento do imunossupressor. O mesmo acontece no estado de Minas Gerais, onde a espera pelo recebimento do fármaco já chega a seis meses (Jornal Hoje em Dia, 2019).

## 1.2. OJETIVO GERAL

A presente dissertação tem como objetivo geral a avaliação da produção de tacrolimo pela *Streptomyces tsukubaensis* utilizando óleo de coco, glicose e óleo de castanha-do-Brasil como fontes de carbono.

Já os objetivos específicos foram:

- estabelecer uma relação entre a quantidade de biomassa produzida durante a fermentação e a fonte de carbono utilizada;
- avaliar a produção específica de tacrolimo;
- monitorar a quantidade de açúcares e proteínas presentes no meio ao longo do processo;
- entender as variações de pH ao longo da fermentação.

# CAPÍTULO 2

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

No capítulo 2 são apresentadas informações relevantes à respeito do tacrolimo. Entre os temas discutidos abordados, destacam-se: características gerais do fármaco, contextualização do processo fermentativo para a produção do FK506, regulação da fermentação pelas fontes de carbono, nitrogênio e fosfato, óleos vegetais como fontes de carbono e avanços na produção do tacrolimo.

### 2.1. Aspectos gerais e características físico-químicas do tacrolimo

O tacrolimo, também conhecido pela sigla FK506, é um fármaco com alta atividade imunossupressiva descoberto no Japão pela Fujisawa Pharmaceutical em 1984 (TANAKA *et al.*, 1987). Assim como a rapamicina e a ciclosporina A, o FK506 pertence aos grupo dos policetídeos, os quais são produtos naturais importantes para a medicina graças às suas propriedades antibióticas, antifúngicas, imunossupressivas e anticancerígenas (STAUNTON e WEISSMAN, 2001). Apesar da sua descoberta no início da década de 1980, o tacrolimo só passou a ser comercializado 10 anos depois, passando também a ser produzido nos EUA e na Alemanha (KIM e PARK, 2008).

Com relação à sua estrutura química, o tacrolimo é um macrolídeo que possui um anel de lactona de 23 membros. Sua fórmula química é  $C_{44}H_{69}NO_{12}$ , possuindo uma massa molar de 804 g/mol e ponto de fusão de 127-129 °C. Além disso, ele é um composto hidrofóbico solúvel em vários solventes orgânicos tais como etanol, acetona, acetonitrila, clorofórmio e éter dietílico (WALLEMACQ e REDING, 1993). Quando em estado sólido (pó cristalino branco) é estável durante muitos meses a temperatura ambiente, tendo sua estabilidade diminuída



quando em solução (TANAKA *et al.*, 1987). A Figura 1.1 representa a estrutura molecular do FK506.

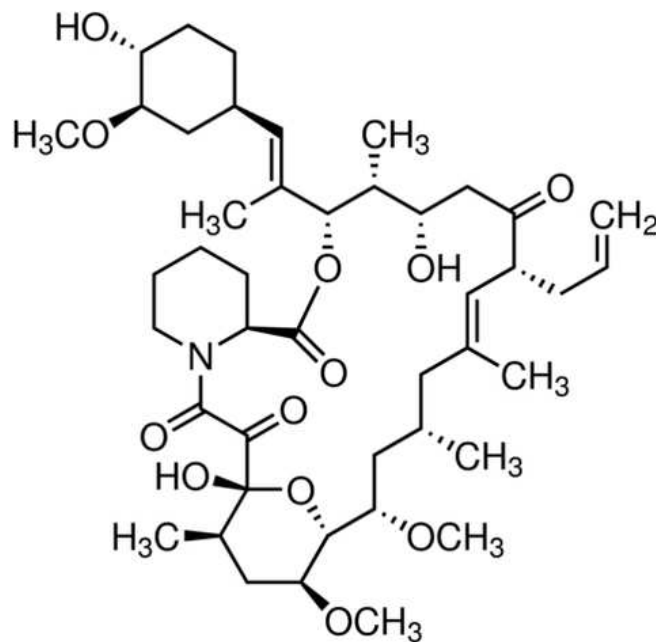


Figura 2.1 – Estrutura molecular do FK506 (Adaptado de: [www.stressmarq.com](http://www.stressmarq.com))

## 2.2. Mecanismo de ação e aplicações do tacrolimo

Inicialmente a ciclosporina era o imunossupressor mais utilizado, sendo aplicada em terapias contra rejeição de coração, rins e pulmão (COHEN *et al.*, 1984). Todavia, testes *in vitro* revelaram as atividades imunossupressivas do tacrolimo, sendo até 100 vezes mais potentes que as da ciclosporina (LIN *et al.*, 1991; COX E FREESE, 1996). Além disso, estudos reportaram que quando comparado à ciclosporina, o FK506 possui maior biodisponibilidade, menor taxa de rejeição e menores efeitos colaterais, o que contribuiu para que seu uso fosse mais difundido ao longo do tempo (HENRY, 1999; GARCIA *et al.*, 2004).

Apesar de possuírem estruturas químicas diferentes, o mecanismo de ação do tacrolimo e da ciclosporina são semelhantes. Enquanto o tacrolimo se liga à FKBP 12 e altera o caminho de transdução no sinal de imunotivação das células T, a ciclosporina se liga à ciclofinila, inibindo a fosfatase calcineurina, fazendo com que não ocorra a expressão de genes de

proteínas relacionadas à ativação celular e geração do linfócito T. (HENRY, 1999; GARCIA *et al.*, 2004).

As aplicações do tacrolimo têm aumentado desde a sua descoberta em 1984. Inicialmente, seu uso se limitava à imunossupressão, principalmente após transplantes de fígado, rins e pâncreas (JORDAN *et al.*, 1999; FUNG, 2004). No entanto, o fármaco é utilizado no tratamento de doenças dermatológicas como a dermatite atópica, foliculite decalvante e o vitiligo (GRIMES *et al.*, 2004; BASTIDA *et al.*, 2012; CAVALIÉ *et al.*, 2015), além de suas aplicações oftalmológicas, sendo eficiente no tratamento da conjuntivite alérgica e da síndrome do olho seco (MOSCOVICI *et al.*, 2015; SHOUGHY *et al.*, 2016).

Quando utilizado como imunossupressor, o tacrolimo é absorvido rapidamente atingindo seu pico de concentração plasmática nas primeiras três horas após sua ingestão (LI *et al.*, 2015). A absorção desse medicamento não é dependente da bile, o que faz com que sua utilização em transplantes hepáticos seja uma vantagem (VENKATARAMANA *et al.*, 1995). Jordam *et al.* (1999) investigaram a eficácia a longo prazo do uso de tacrolimo após transplante de pâncreas. Para isso, foram monitorados 60 pacientes transplantados ao longo de dois anos. Os resultados mostraram que mais de 80 % desses sobreviveram após o procedimento e não apresentaram intoxicação resultante do tratamento, o que demonstra que o uso do FK506 é uma boa alternativa após transplante de pâncreas. O trabalho publicado por Vincenti *et al.* (2002) revelou que pacientes que foram tratados com tacrolimo após transplante de rins, tiveram menor rejeição do enxerto quando comparados àqueles que utilizaram a ciclosporina. O estudo conduzido por Haddad *et al.*, (2006) mostrou que o FK506 é mais eficiente que a ciclosporina na prevenção da rejeição de transplantes de fígado, além de aumentar a longevidade do órgão. Além disso, tem sido investigada a eficácia do tratamento de imunossupressão utilizando tacrolimo (FK506) e micofenolato de mofetila (MMF) (KOBASHIGAWA *et al.*, 2006; SPIEKERKOETTER *et al.*, 2019; ZENG *et al.*, 2019). Zeng *et al.* (2019) estudaram terapias utilizando a combinação desses dois fármacos no tratamento de pessoas que fizeram transplante de fígado. Os resultados mostraram que a associação desses compostos é mais eficiente que o tratamento utilizando apenas FK506. Recentemente, estudo publicado por Hanaoka *et al.* (2019), demonstrou que o tratamento imunossupressivo utilizando doses fracionadas de tacrolimo foi eficaz em macacos, já que houve a diminuição da rejeição aguda dos órgãos transplantados. Essa contribuição pode ser interessante para motivar estudos futuros avaliando a possível aplicação dessa metodologia em seres humanos.

Com relação ao uso tópico, o FK506 é mais eficiente que a ciclosporina, já que este possui massa molar mais baixa, o que permite uma absorção rápida do medicamento pela pele (DE TRAN *et al.*, 2001). O trabalho realizado por Grimes *et al.* (2002) investigou a eficiência do uso tópico do tacrolimo para repigmentação da pele. Nesse estudo, seis pacientes de diferentes faixas etárias e sexo foram avaliados. Os resultados revelaram que cinco desses pacientes conseguiram altas taxas de repigmentação da pele, variando entre 50 e 100%. Rahman *et al.* (2016) investigaram a eficiência do FK506 no tratamento de dermatite atópica, realizando um estudo de caso em sessenta pacientes com idades entre 2 e 45 anos, sendo que a metade das pessoas foram tratadas com uma pomada contendo tacrolimo 0,03%, enquanto a parcela restante foi tratada com um umectante a base de vaselina. Ao fim do estudo, pôde-se observar que o uso da pomada a base de tacrolimo não estimulou efeito colateral nos pacientes, além de ter diminuído a inflamação dermatológica provocada pela dermatite, mostrando-se como uma alternativa eficiente para o tratamento dessa doença.

A literatura também reporta o uso do tacrolimo em terapias oculares. Al-Amri *et al.* (2017) avaliaram a eficácia da utilização de uma suspensão contendo 0,003% de tacrolimo no tratamento da ceratoconjuntivite. Os resultados mostraram que o fármaco se mostrou como opção segura e eficaz, sendo uma excelente alternativa ao uso de esteróides. Já a pesquisa conduzida por Moscovici *et al.* (2012), avaliou o tratamento de pacientes que sofriam da síndrome do olho seco utilizando um colírio a base de tacrolimo e óleo de oliva. Ao longo da avaliação, percebeu-se que a utilização do FK506 0,03% foi benéfica, uma vez que o colírio foi capaz não só de aumentar a estabilidade das lágrimas, como também de melhorar a superfície ocular dos pacientes avaliados.

### **2.3. Transplantes de órgãos e uso do tacrolimo no Brasil**

Os transplantes de órgãos começaram a ser realizados no Brasil nos primeiros anos da década de 1960. Todavia, essa prática foi mundialmente suspensa no início dos anos 1970 graças aos maus resultados atingidos (GARCIA, 2002). Com a descoberta da ciclosporina, e posteriormente do FK506, melhores resultados foram atingidos, fazendo com que os programas de transplante fossem reabertos no início da década de 1980, começando pelos transplantes cardíacos (1984), hepáticos (1985) e pancreáticos (1987) (PEGO-FERNANDES e GARCIA, 2010).

Atualmente o panorama dos transplantes no Brasil é positivo, uma vez que o número de doadores tem aumentado, assim como o total de transplantes realizados anualmente. Uma reportagem exibida pelo Jornal Nacional em março de 2018 revelou que foram realizados 27 mil transplantes de órgãos no Brasil no ano de 2017, representando um recorde nacional até a data. O maior número de doações foi registrado no estado de Santa Catarina.

De acordo com uma matéria publicada pelo Ministério da Saúde em setembro de 2018, no Brasil, o número de doadores de órgãos efetivos em 2018 aumentou em 7% em relação ao ano de 2017, alcançando um total de 1.765. Dessa forma, seria atingida uma taxa de 17 doadores efetivos por milhão de população, ultrapassando a meta prevista para esse ano. Além disso, estimou-se que 26.400 transplantes deveriam ser realizados em 2018, o que representaria um recorde em comparação aos 8 últimos anos.

Contudo, com o aumento do número de transplantes realizados, cresceu também a demanda por imunossupressores para evitar a rejeição dos órgãos transplantados. O FK506 é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) desde 2012, fazendo parte da lista de medicamentos de alto custo (Portal Federativo, 2012). Todavia, foram registradas falhas no oferecimento do medicamento desde então.

Em 2017 foi registrada a falta do fornecimento de FK506 em 7 estados brasileiros. O Ministério da Saúde relatou que a falha na distribuição do medicamento estava associada a problemas com os fornecedores, mas que a situação não demoraria a se regularizar (Folha de São Paulo, 2017).

Conforme matéria publicada pela Agência Brasil em março de 2018, por volta de 34 mil brasileiros utilizam o tacrolimo como imunossupressor, sendo que tal medicamento deve ser utilizado por toda a vida de um indivíduo transplantado. A reportagem revela ainda que a partir de 2018, a produção nacional de FK506 deixaria de ser responsabilidade da Libbs Farmacêutica, a qual transferiu a tecnologia de produção para a Farmanguinhos, que está vinculada à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Uma reportagem publicada pela Folha de São Paulo em março de 2019 revelou que pacientes não estavam tendo acesso ao FK506 disponibilizado pelo SUS. O Ministério da Saúde alegou o acontecimento de um incêndio na fábrica do laboratório responsável pela produção do medicamento, mas que a situação se regularizaria em abril.

Segundo notícia publicada no site da Fiocruz em maio de 2019, nesse ano serão fabricadas mais de 90 milhões de unidades de tacrolimo com o intuito de suprir a falta desse medicamento disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Até a data da reportagem, haviam sido enviadas mais de 1 milhão de cápsulas de tacrolimo de 1 mg para o Serviço de Armazenagem e Distribuição de Medicamentos do Ministério da Saúde.

#### **2.4. O gênero *Streptomyces***

As *Streptomyces* são um grupo de bactérias gram-positivas filamentosas encontradas no solo. Durante o crescimento, essas bactérias são capazes de formar hifas, as quais auxiliam na fixação do substrato, produção de esporos e digestão extracelular, o que contribui para a sobrevivência desses seres vivos em ambientes extremos (DE LIMA PROCÓPIO *et al.*, 2012). Uma vez que as *Streptomyces* são encontradas em ambientes adversos, essas competem nutrientes com outros microorganismos, sendo capazes de produzir substâncias fungicidas e bactericidas para garantir sua sobrevivência (XIONG e KONG, 2004). Além disso, esse gênero de bactérias é importante para a medicina, pois são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ter função antibiótica, imunossupressora, antiviral e antitumoral (PATZER e BRAUN, 2010; KHAN *et al.*, 2011).

O tacrolimo é um metabólito secundário produzido durante a fermentação utilizando a *Streptomyces tsukubaensis* (TANAKA *et al.*, 1987). A literatura reporta várias espécies do gênero *Streptomyces* que são capazes de produzir o FK506, mas graças à falta de estudos taxonômicos severos, não foram estabelecidas relações filogenéticas claras entre essas espécies, sendo a *Streptomyces tsukubaensis* a mais utilizada (BARREIRO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014).

#### **2.5. Biossíntese do tacrolimo**

Assim como todos os processos biossintéticos, o processo fermentativo para produção do tacrolimo é sensível a muitas variáveis como pH, temperatura, nutrientes disponíveis no meio de cultura, agitação e fornecimento de oxigênio (YOON e CHOI, 1997; SINGH E BEHERA, 2009; BARREIRO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014). Os desafios relacionados à produção do FK506 em escala industrial são o baixo rendimento do processo e a complexa

purificação do fármaco, uma vez que outros subprodutos são excretados pela bactéria durante seu metabolismo secundário (JUNG *et al.*, 2011; GORANOVIČ *et al.*, 2012).

## 2.6. Avanços na biossíntese do tacrolimo

As principais estratégias utilizadas para aumentar a produção de FK506 pelos mais variados grupos de pesquisa dessa área, é o uso da suplementação e da modificação genética da bactéria (LI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2017a; TURŁO *et al.*, 2012). Em um estudo realizado por Mo *et al.* (2009), o metil oleato foi concebido como precursor do tacrolimo em uma fermentação utilizando a *Streptomyces clavuligerus*. Esse processo foi conduzido durante 6 dias em um *shaker* orbital ajustado com rotação de 180 rpm, temperatura de 28 °C e pH do meio igual a 7,2. Como resultado, a produção do fármaco obtida foi 2,5 vezes maior que a produção do controle.

Seguindo a estratégia da suplementação, Turlo *et al.* (2012) conduziram uma fermentação utilizando a *Streptomyces tsukubaensis* em um *shaker* orbital durante 10 dias, utilizando temperatura de 30 °C e rotação de 110 rpm. As culturas foram enriquecidas individualmente com ácido picolínico, ácido pipercolico, ácido nicotínico e nicotinamida, obtendo produções iguais a 7, 6, 3 e 5 vezes maiores que o controle, respectivamente.

Em um estudo realizado por Huang *et al.* (2013), foi feita uma modificação genética na bactéria *Streptomyces tsukubaensis* com o objetivo de aumentar a produção de FK506. Os resultados mostram que a bactéria modificada teve uma produção de fármaco de 10 a 40% maior que a produção da bactéria original. Além disso, também foi feita a suplementação da fermentação com vários nutrientes, incluindo óleo de soja, lactato, ácido succínico, ácido xiquímico, ácido corísmico, ácido pipercolico, isoleucina, lisina e valina, obtendo uma produção 70% maior que o controle, demonstrando que a combinação de modificação genética e suplementação é uma boa estratégia para o aumento da produção de FK506.

Du *et al.*, (2014) combinaram o uso da *Streptomyces tsukubaensis* modificada geneticamente com a fermentação realizada em biorreator com batelada alimentada. A maior produção alcançada utilizando a cepa modificada e a suplementação com malonato de dissódio e metilmalonato dissódico foi igual a 514,5 mg/L em um biorreator de 7,5 L.

Gajzlerska *et al.*, (2015) otimizaram a produção do tacrolimo por meio do uso de ácido propiônico, propilenoglicol e propanol como suplementos da fermentação, aumentando a

produção de FK506 em 5,5; 3,5 e 1,8 vezes respectivamente. Os experimentos foram conduzidos durante 10 dias em um *shaker* com rotação de 110 rpm e temperatura de 30 °C. A concentração ótima dos precursores foi de 0,75% para o propilenoglicol e 0,25% para o propanol e ácido propiônico. Além disso, percebeu-se que cada aditivo atuou em uma fase da fermentação, sendo que o propilenoglicol induziu o crescimento miscelial da *Streptomyces*, enquanto o ácido propiônico agiu como precursor na biossíntese do tacrolimo.

Mo *et al.*, (2013) também investigaram a modificação genética da bactéria seguida da suplementação para aumentar a produção do fármaco. Os autores utilizaram a mutagênese aleatória para produzir a cepa modificada. A fermentação foi suplementada com vinil acetato, vinil propionato e vinil pentanoato, sendo o último o precursor mais eficaz para o processo.

Li *et al.*, (2019) realizaram análises metabolômicas que revelaram que o ácido xiquímico e a alanina são importantes precursores do tacrolimo. Dessa forma, essas substâncias juntamente com o n-dodecano foram adicionados ao meio da fermentação, resultando em um aumento de 49,5% na produção de FK506.

## **2.7. Regulação pela fonte de nitrogênio**

O nitrogênio pode ser considerado um dos constituintes mais importantes dos seres vivos, sendo que a forma como ele é fornecido em processos fermentativos influencia em uma série de mecanismos, incluindo a formação de enzimas, produtos intermediários e produtos finais (DAHAL *et al.*, 2017; MAGASANIK, 1976). Amônia, asparagina, glutamato e glutamina são algumas fontes primárias de nitrogênio utilizadas preferencialmente por microorganismos. Caso não haja disponibilidade dessas substâncias no meio, ou a quantidade acessível não é suficiente, fontes secundárias são utilizadas, como por exemplo nitratos, amidas, nitritos, aminoácidos e peptídeos (DA CRUZ *et al.*, 2012). Dessa forma, microorganismos desenvolveram mecanismos capazes de avaliar e regular qual melhor fonte de nitrogênio presente no meio, sendo que a síntese enzimática utilizando outras fontes de nitrogênio é reprimida até que as fontes primárias sejam esgotadas (SANCHEZ E DEMAINE, 2002). Alguns exemplos de metabólitos secundários cuja produção é influenciada pela presença de compostos nitrogenados estão representados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Fontes de nitrogênio que interferem na produção de metabólitos secundários

Fonte de nitrogênio interferente	Metabólito secundário
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Leucomicina
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Streptomicina
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e l-lisina	Penicilina
Nitrato	Aflatoxina
Nitrato, l-glutamato e ureia	Alternariol
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Tetraciclina
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e l-lisina	Cefalosporina

Adaptado de: Sanches e Demain (2002)

Os sais de amônio, por exemplo, são fontes de nitrogênio que são favoráveis ao crescimento dos microorganismos, mas que influenciam negativamente uma série de vias metabólicas secundárias. Para tentar resolver esse problema, a composição dos meios fermentativos complexos frequentemente inclui uma proteína, enquanto os meios definidos costumam conter aminoácidos que são metabolizados lentamente, estimulando assim a produção de metabólitos secundários (SANCHEZ E DEMAINE, 2002).

Um estudo publicado por Martinez-Castro *et al.* (2013) investigou a influência das fontes de nitrogênio na produção de FK506 pela *Streptomyces tsukubaensis*. Os resultados mostraram que a adição de extrato de levedura e peptona aumentou a taxa de crescimento da bactéria, mas inibiu totalmente a produção do tacrolimo. O sulfato de amônio em uma concentração de 2 g/L, se mostrou como a melhor fonte de nitrogênio para a produção do fármaco, sendo que maiores concentrações dessa substância também inibem a formação de FK506.

Mishra e Verma (2012) avaliaram a influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na produção de tacrolimo via fermentação da *Streptomyces tsukubaensis*. Ao fim do estudo, foi possível perceber que as fontes inorgânicas de nitrogênio foram mais eficientes para o processo, quando comparadas às fontes orgânicas. A fonte de nitrogênio que possibilitou maior produção de FK506 foi o sulfato de amônio.



## 2.8. Regulação pela fonte de fosfato

A disponibilidade de fósforo costuma ser bastante limitada em ambientes naturais, o que fez com que microorganismos desenvolvessem estratégias de otimizar a utilização dessa substância. Em processos fermentativos, o íon fosfato está diretamente ligado à produção de enzimas e metabólitos secundários, como por exemplo ácido clavulânico, tetraciclina, cefalosporina, gentamicina, e candicina (SANCHEZ E DEMAINE, 2002), como também auxilia na manutenção da estrutura do DNA e RNA, se liga a lipídeos para a formação de membranas celulares e realiza ligações nas moléculas de ATP (ROMERO-RODRIGUEZ *et al.*, 2018). Sabe-se que embora concentrações de fosfato superiores a 3-5 mM estimulem o crescimento celular dos microorganismos, elas inibem a produção de metabólitos em culturas líquidas (LIRAS *et al.*, 1977). No entanto, é importante enfatizar que a produção dessas substâncias não é igualmente afetada pela presença de fontes de fosfato. A síntese de antibióticos beta-lactâmicos, por exemplo, não é reprimida por altas concentrações de fosfato (MARTIN, 1977).

O fosfato é comumente empregado em fermentações utilizando a *Streptomyces tsukubaensis* para produção de tacrolimo (TURLO *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2013). Martinez-Castro *et al.* (2013) avaliaram a influência de três concentrações de fosfato inorgânico (2,5mM; 10mM e 20mM) na produção do tacrolimo. Foi possível observar que o início da produção do tacrolimo se deu justamente quando a quantidade de fosfato foi esgotada, revelando a influência negativa da presença desse composto na produção do metabólito.

## 2.9. Regulação pela fonte de carbono

Sabe-se que o fornecimento de carbono é de extrema importância para o sucesso de uma fermentação. Os microorganismos são capazes de quebrar moléculas orgânicas de alto peso molecular durante seu metabolismo, convertendo essas substâncias em vitaminas, nucleotídeos, aminoácidos e carboidratos, que posteriormente serão utilizados para produção de proteínas, coenzimas, polissacarídeos e lipídeos, os quais podem ser utilizados durante seu crescimento ou excretados (AHARONOWITS e DEMAINE, 1978; SANCHEZ e DEMAINE, 2002).

A produção de metabólitos secundários está intimamente ligada às fontes de carbono utilizadas no processo fermentativo (DEMAINE, 1976). Substâncias como glicose, sacarose, licor de milho e melaço são usualmente utilizados como fontes de carbono em fermentações. Todavia, em muitos casos existe um efeito negativo exercido por esses compostos orgânicos,

que por sua vez acabam limitando o metabolismo secundário dos microorganismos utilizados (SANCHEZ e DEMAIN, 2002). Esse efeito é característico de um mecanismo conhecido como repressão catabólica de carbono (CCR) que é extremamente útil para entender o consumo de carbono em bioprocessos (MAGASANIK, 1961). O CCR é caracterizado pela repressão de genes necessários para a utilização de fontes secundárias de carbono graças à presença de um substrato preferido pela bactéria, o que acarreta na diminuição ou inibição da produção de metabólitos secundários (STÜLKE e HILLEN, 1999; RUIZ *et al.*, 2010). Diversos compostos orgânicos são conhecidos por interferir na síntese de metabólitos secundários, entre eles estão a glicose, xilose, sacarose e glicerol (RUIZ *et al.*, 2010). A Tabela 2.2 elucida alguns antibióticos cuja produção é reprimida por fontes de carbono.

Tabela 2.2 – Antibióticos produzidos por espécies de *Streptomyces* reprimidos por fontes de carbono

<b>Espécie</b>	<b>Antibiótico produzido</b>	<b>Repressor</b>
<i>Streptomyces parvalus</i>	Dactinomicina	Glicose, glicerol
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Cefamicina	Glicose, glicerol
<i>Streptomyces lividans</i>	Undecilprodigiosina	Xilose
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Cloranfenicol	Glicose
<i>Streptomyces garyphalus</i>	Oxamicina	Glicerol

Adaptado de: ROMERO-RODRÍGUEZ *et al.* (2017)

Embora a glicose seja uma ótima fonte de carbono para o crescimento bacteriano, quando utilizada em grandes quantidades a mesma pode interferir na produção de metabólitos secundários, além de prejudicar a diferenciação morfológica (DEMAIN, 1976). Nesse contexto, surge a necessidade de encontrar outras fontes de carbono que sejam adequadas para o crescimento bacteriano sem interferir no metabolismo secundário desses microorganismos. No caso das *Streptomyces*, essa questão seria mais facilmente resolvida se o mecanismo CCR em bactérias desse gênero fosse inteiramente desvendado. Todavia, ainda não existe uma hipótese totalmente aceita pela comunidade científica (ROMERO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

## **2.10. Uso de óleos vegetais como fontes de carbono**

Na tentativa de aumentar a produção de FK506, muitos grupos de pesquisa têm buscado novas fontes de carbono que atuam como precursores do tacrolimo. Nesse contexto, os óleos vegetais aparecem como boas alternativas, uma vez que servem como fonte suplementar de

nutrientes, além de possuírem propriedades anti-espumantes (JONES e PORTER, 1998; ROLS e GOMA, 1991). A literatura reporta diversos trabalhos que obtiveram sucesso utilizando óleos vegetais na suplementação da fermentação da *Streptomyces tsukubaensis*.

Singh & Behera (2009) realizaram um estudo substituindo as fontes de carbono tradicionais por óleos vegetais (óleo de algodão, óleo de soja e óleo de amendoim). O estudo foi realizado durante 120 horas em um *shaker* orbital, com rotação igual a 220 rpm, temperatura de 28 °C e pH igual a 7,3. Também foi testada a adição de diversos aminoácidos. Os resultados mostram que alguns aminoácidos fazem com que a produção do fármaco seja reduzida, como é o caso da metionina e da fenilalanina. Entretanto, a l-lisina aumentou significativamente a produção do tacrolimo, sendo a produção máxima alcançada em uma concentração de aminoácido igual a 0,2 g/L. Com relação às fontes de carbono, o óleo de soja alcançou a maior produção de FK506.

Um estudo conduzido por Xia *et al.* (2013) realizou uma fermentação para produção de FK506, utilizando o óleo de soja como fonte de carbono suplementar. O óleo foi adicionado 24 h depois do início da fermentação em uma concentração igual a 5 g/L. Essa estratégia foi bastante promissora, uma vez que foi observado um aumento na produção de tacrolimo de 44%.

Mishra e Verma (2012) estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono na suplementação da fermentação da *Streptomyces tsukubaensis*. Foram testados açúcares simples (glicose, frutose, sacarose, maltose e lactose), e fontes de carbono mais complexas (óleo de amendoim, óleo de algodão, óleo de girassol e óleo de colza). Os resultados mostraram que os óleos vegetais são fontes promissoras de carbono na fermentação para produção de tacrolimo, já que todos eles obtiveram maiores concentrações de fármaco produzido, quando comparado aos açúcares convencionais. A maior produção de FK506 foi obtida em um ensaio utilizando o óleo de soja como fonte de carbono (116,4 mg/L), seguida do ensaio em que o óleo de colza foi usado (112,9 mg/L).

Mo *et al.* (2013), analisaram o efeito da adição de óleo de oliva, óleo de soja e óleo de milho em fermentações para produção de FK506 utilizando uma cepa do gênero *Streptomyces* modificada geneticamente. Ao fim dos ensaios, pôde-se observar que a adição de óleos vegetais teve um impacto positivo na concentração de tacrolimo produzida, sendo que a maior produção específica atingida foi a do ensaio em que o óleo de milho foi utilizado como fonte de carbono (59,77 mg/g).

### **2.11. Produção de oleaginosas no Brasil**

Os óleos vegetais são compostos majoritariamente por ácidos graxos, os quais são ácidos carboxílicos de cadeia saturada ou insaturados. Essas substâncias possuem variadas funções e aplicações, sendo largamente produzidos a nível nacional e mundial (GIOIELLI, 1996). A produção mundial de óleos vegetais teve um aumento de 400% entre 1974 e 2006, chegando a serem produzidas 123,1 milhões de toneladas (NUNES, 2007).

Segundo um estudo publicado pela Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove) em Julho de 2017, o processamento de oleaginosas no Brasil tem aumentado, sendo que os estados de Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul são os que mais se destacam nessa atividade, tendo capacidade de processar 41.259, 35.839 e 30.190 toneladas/dia, respectivamente. Além disso, um relatório publicado pelo Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento em Agosto de 2012 reporta que a produção de oleaginosas no Brasil cresceu, atingindo uma produção de 70436 mil toneladas na safra de 2011.

### **2.12. Aspectos gerais dos óleos de coco e de castanha-do-Brasil**

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma espécie nativa da Amazônia que também pode ser encontrada em outras partes do país, presente principalmente nos estados do Amazonas, Acre, Pará, Mato Grosso e Rondônia. Suas sementes são altamente nutritivas, tendo um valor proteico e lipídico expressivo (MULLER *et al.*, 1994). O óleo de castanha-do-Brasil é obtido através da prensagem da castanha e apresenta em média uma constituição de 85% de ácidos graxos insaturados, sendo o ácido graxo oleico seu principal constituinte. Entre seus constituintes minoritários podem ser citados o ácido graxo palmítico (13,8%), ácido graxo esteárico (8,7%) e o ácido graxo linoléico (31,4%) (TATEO, 1971).

O óleo de coco é extraído da polpa seca do coco, o qual é o fruto de uma árvore tropical (*Cocos nucifera*), cujo crescimento é favorecido em clima quente e úmido. Essa árvore é encontrada em muitos países de clima tropical, incluindo o Brasil, estando presente principalmente na região Nordeste, sendo que os estados da Bahia, Sergipe e Ceará se destacam na produção de coco (CHAN e ELEVITCH, 2006). Para a produção do óleo, é realizada a prensagem da polpa seca do fruto, seguida de uma extração (BURNETT *et al.*, 2011). Os principais ácidos graxos que compõe o óleo de coco são os ácidos caprílico (4,7%), cáprico

(4,1%), láurico (40,8%), mirístico (20,3%), palmítico (12,3%), oléico (9,9%) e linoléico (3,6%). Portanto, a maior parte deles é de cadeia saturada (CORREIA *et al.*, 2014).

Costa *et al.* (2006) utilizaram óleos nacionais como fontes de carbono em um processo fermentativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* visando a produção de ramnolipídeos. Foram utilizados os óleos de buriti, cupuaçu, andiroba, maracujá, castanha-do-Brasil e babaçu. Os resultados mostraram que a maior concentração do produto desejado foi obtida na fermentação utilizando o óleo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono. Dado o exposto, foi realizada uma busca profunda na literatura sobre o uso desse óleo como fonte de carbono em fermentações utilizando o gênero de bactérias *Streptomyces*. Todavia, nenhum dado foi encontrado na literatura consultada.

Um estudo realizado por Arunsasi *et al.* (2010), investigou a utilização da polpa seca do coco como fonte de carbono em uma fermentação para produção de amilase utilizando *Aspergillus flavus*. Essa estratégia se mostrou altamente eficiente, uma vez que o ensaio utilizando essa fonte de carbono apresentou a maior concentração de amilase produzida. Não foram reportadas na literatura fermentações em *Streptomyces* utilizando óleo de coco como fonte de carbono.

### 2.13. Métodos de quantificação do tacrolimo

O tacrolimo apresenta peculiaridades em relação à sua estrutura como por exemplo a isomerização cis-trans. A atividade imunossupressiva desse fármaco está associada à conformação trans, ainda que em estado sólido o FK506 também pode existir na conformação cis. Quando em solução, o tacrolimo sofre reação de epimerização, formando outros dois tautômeros I e II (tacrolimo dio e tacrolimo c10, respectivamente), sendo que as três formas permanecem em equilíbrio solução (TANAKA *et al.*, 1987; NAMIKI *et al.*, 1995;). A primeira reação de epimerização começa quando o grupo amida ligado à estrutura pipecólica do tacrolimo sofre rotação, resultando em uma isomeria cis-trans. Em seguida, o grupo diol do tautômero I sofre hidratação, formando o tautômero II (PETERKA *et al.*, 2015). Além da presença de água, a reação de epimerização do FK506 também é influenciada pela temperatura e pelo pH. De acordo com Akashi *et al.* (1996), altas temperaturas e condições de pH neutro fazem com que a velocidade da reação aumente. A Figura 2.2 representa o tacrolimo e seus tautômeros I e II.

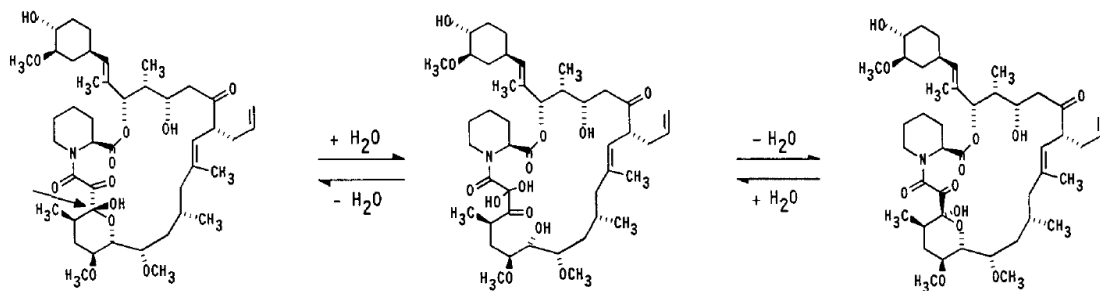


Figura 2.2 – Tacrolimo, tacrolimo diol e tacrolimo C10, respectivamente. Adaptado de Akashi *et al.* (1996)

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês High Performance Liquid Chromatography), também conhecida pela sigla HPLC, é uma técnica de separação importante, já que a mesma consegue separar misturas que contenham grande quantidade de compostos similares. A principal vantagem oferecida por essa técnica é a capacidade de realizar análises químicas de uma grande variedade de compostos com alta resolução e eficiência em uma escala de minutos, sendo muito utilizada em laboratórios químicos, bioquímicos e farmacêuticos (COLLINS *et al.*, 2006). Dessa forma, a cromatografia líquida de alta eficiência se mostra como uma técnica eficaz para a quantificação do tacrolimo (NAMIKI *et al.*, 1995).

Diferentes métodos de preparo de amostra e quantificação do tacrolimo foram desenvolvidos e aplicados desde o início da produção do fármaco. Namiki *et al.* (1995), desenvolveram e validaram um método de quantificação do FK506 utilizando uma coluna C18. O tacrolimo encontrava-se em equilíbrio com seus tautômeros I e II em uma solução de água e álcool anidro. A detecção foi feita a 220 nm e a fase móvel era composta por água, álcool isopropílico e tetrahydrofurano.

Akashi *et al.* (1996) realizaram a quantificação do tacrolimo em um cromatógrafo da marca Shimadzu, utilizando um comprimento de onda de 215 nm. Inicialmente, as amostras da fermentação foram coletadas, sendo que a cada uma delas foi adicionado acetona em igual volume. Depois disso, as amostras foram filtradas e diluídas com um reagente conhecido como BRIJ 35. Em seguida, as mesmas eram deixadas em repouso durante 15 minutos, sendo que após essa pausa elas estavam prontas para serem injetadas. A fase móvel utilizada era composta por acetonitrila, água e ácido fosfórico em uma proporção volumétrica de (600:400:1). O ácido fosfórico foi adicionado com o objetivo de acelerar a eluição das impurezas provenientes da fermentação que poderiam se fazer presentes na amostra. Os volumes injetados de amostra eram iguais a 20  $\mu$ L.

Turlo *et al.* (2012) realizaram coletas de 80 mL de amostras provenientes de uma fermentação utilizando a *Streptomyces tsukubaensis*. As amostras foram homogeneizadas em banho ultrassônico durante 10 minutos, sendo adicionados 80 mL de acetona às mesmas. Em seguida, cada amostra foi filtrada, evaporada e redissolvida em 20 mL de etanol, estando assim prontas para serem quantificadas. A quantificação foi realizada em um cromatógrafo, a uma temperatura de 60 °C e comprimento de onda de 214 nm. A fase móvel utilizada era composta por água e acetonitrila em uma proporção volumétrica (75:25), e os volumes de amostra injetados iguais a 20 µL.

Wang *et al.* (2017b), coletaram amostras da fermentação, e em seguida, adicionaram às mesmas igual volume de acetona (o volume coletado não foi especificado pelos autores). Depois disso, as amostras eram agitadas durante 2,5 h em banho maria a 50 °C. Decorrido esse tempo, as amostras eram centrifugadas e posteriormente filtradas utilizando um filtro de 0,22 µm, estando assim prontas para serem injetadas no cromatógrafo. A quantificação foi conduzida em um cromatógrafo (122; Agilent Technologies), equipado com uma coluna C18, sendo escolhido o comprimento de onda igual a 210 nm. A fase móvel era composta por acetonitrila e uma solução aquosa de ácido fosfórico em uma proporção volumétrica de (65:35).

#### **2.14. Trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa**

O estudo conduzido por Moreira (2018) avaliou a utilização da glicose e da maltose como fontes primárias de carbono, e da peptona de soja e do licor de milho como fontes de nitrogênio na fermentação da *Streptomyces tsukubaensis* para a produção do tacrolimo. Além disso, também foi investigada a influência do valor de temperatura no processo em questão. A fermentação conduzida utilizando maltose como fonte de carbono resultou em uma produção específica de tacrolimo maior que o processo conduzido utilizando glicose. Com relação à temperatura, verificou-se que a diminuição da temperatura (30 °C para 28 °C) ocasionou um aumento da produção de fármaco.

O trabalho de Ferrari (2018) desenvolveu um processo de purificação do tacrolimo proveniente de qualquer meio fermentativo. A técnica desenvolvida consiste na pré-purificação do caldo fermentado, seguido de purificação utilizando técnicas cromatográficas. Na pré-purificação, o fermentado foi extraído com acetona, concentrado por meio de evaporação e tratado com a resina DIAION® HP-20. Em seguida, foi realizada a purificação por intermédio de 2 sistemas cromatográficos, ambos utilizando acetonitrila e água como fase móvel. A

primeira coluna usou um grupo amino (NH<sub>2</sub>) ligado à sílica para isolar o tacrolimo, enquanto a segunda empregou o octadecilsilano (C18). Os resultados mostraram que o produto final apresentou 98% de pureza, sendo que 97% dos açúcares redutores e proteínas totais contidos no meio foram removidos após a pré-purificação



# CAPÍTULO 3

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

Esse capítulo descreve os materiais e métodos utilizados ao longo da pré-inoculação, inoculação e fermentação, bem como durante as quantificações do fármaco e dos subprodutos presentes no meio fermentativo (proteínas e açúcares).

O processo fermentativo foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renováveis (LEBBPOR) do Departamento de Engenharia de Processos (DEPro) - UNICAMP. Já os ensaios relacionados à quantificação do tacrolimo foram realizados no Laboratório de Processos de Transferência de Massa (LPTM), também pertencente ao Departamento de Processos (DEPro).

### 3.1. Bactéria utilizada

A bactéria utilizada neste trabalho é a *Streptomyces tsukubaensis*. A mesma foi comprada pelo Laboratório de Processos de Transferência de Massa (LPTM) junto ao Instituto Leibniz DSMZ. A fim de realizar o correto armazenamento da cepa, esta foi encaminhada ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, sendo encontrada sob a sigla CBMAI – 1832.

### 3.2. Cultivo da bactéria, pré-inoculação, inoculação e fermentação

#### 3.2.1. Cultivo bacteriano

A primeira etapa deste trabalho envolvendo a pré-inoculação, inoculação e fermentação foram desenvolvidas no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de

Origem Renovável (LEBBPOR) localizado na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

O cultivo da bactéria foi realizado em placas de Petri. Para a confecção das mesmas foi utilizado o meio de cultivo recomendado pela DSMZ, o qual está descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Composição do meio de cultivo em placas de Petri

<b>Composto</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Massa (g)</b>
Glicose	Dinâmica	4,0
Extrato de Levedura	KASVI	1,0
Extrato de Malte	KASVI	10,0
CaCO <sub>3</sub>	Dinâmica	2,0
Ágar	KASVI	12,0
Água destilada	-	1000*

\*mL de água destilada

Os reagentes contidos na Tabela 3.1 foram utilizados no preparo das placas de Petri, seguindo as proporções indicadas na mesma. Todos os reagentes sólidos (exceto o ágar) foram solubilizados em água destilada, sendo o pH ajustado para 7,2. Depois disso, o ágar foi adicionado à mistura, que por sua vez foi aquecida a fim de se garantir a completa solubilização do mesmo. Em seguida, a mistura foi esterilizada em autoclave a 120 °C durante 20 minutos e vertida nas placas de Petri, formando camadas de aproximadamente 1 cm de altura. Após o resfriamento e solidificação do meio, as placas de Petri foram inoculadas com as bactérias por meio do uso de alças estéreis descartáveis. Concluída a inoculação, as placas foram lacradas e mantidas em estufa durante 10 dias a 28 °C a fim de se promover o crescimento bacterino no meio sólido.

### 3.2.2. Pré-inoculação e inoculação

Nas etapas de pré-inoculação e inoculação foi utilizado o meio líquido descrito por Turlo *et al.* (2012) o qual está listado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Composição do meio utilizado na pré-inoculação e inoculação

<b>Composto</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Massa (g)</b>
-----------------	-------------------	------------------

Extrato de Malte	KASVI	6
Extrato de Levedura	KASVI	1,2
Glicose	Dinâmica	6
Maltose	Dinâmica	6

Para o preparo do meio líquido utilizado no pré-inóculo e o inóculo, os reagentes descritos na Tabela 3.2 foram solubilizados em 1000 mL de água destilada. Depois disso, fez-se a correção do pH para o valor de 7,2, prosseguindo com a esterilização do meio em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. No pré-inóculo, 100 mL do meio líquido foram transferidos para cada um dos 3 *erlenmeyers* de 250 mL, sendo que uma alça de bactéria era colocada assepticamente em 2 desses *erlenmeyers*, sendo o *erlenmeyer* restante utilizado como controle. Em seguida, os *erlenmeyers* eram encaminhados para o *shaker*, sendo acondicionados a 28 °C e 130 rpm durante 24 h. Tais condições de temperatura e rotação foram utilizadas com base em trabalho anterior desenvolvido no LPTM (MOREIRA *et al.*, 2018), que demonstrou que essas são as melhores condições de cultivo da *Streptomyces tsukubaensis*. Decorridas as 24 h, eram coletadas alíquotas de 1 mL de cada um dos *erlenmeyers* pré-inoculados a fim de verificar o crescimento bacteriano do meio. Tal verificação foi realizada por meio da medição da densidade ótica (absorbância) das amostras utilizando um espectrofotômetro UV da marca IMPLEN, sendo ajustado um comprimento de onda de 600 nm. A medição da densidade ótica deveria ser igual ou superior a 0,6. Feito isso, o *erlenmeyer* com a maior absorbância era utilizado para dar continuidade ao processo (inóculo).

Para o preparo do inóculo, eram utilizados 3 *erlenmeyers* de 500 mL, sendo um deles utilizado como controle. O controle era composto apenas pelo meio líquido estéril, enquanto os outros dois *erlenmeyers* continham 180 mL do meio líquido e 20 mL do pré-inóculo. Os *erlenmeyers* foram mantidos no *shaker* a 28 °C e 130 rpm durante 24 h. A medição da densidade ótica das amostras foi realizada mantendo os mesmos critérios descritos no preparo do pré-inóculo. O *erlenmeyer* de maior absorbância era utilizado na fermentação.

### 3.2.3. Fermentação

O meio de cultivo utilizado na fermentação foi adaptado de Turlo *et al.* (2012), sendo a glicose substituída pelos óleos vegetais. Foram utilizados três meios de cultivo, sendo a fonte

de carbono a única diferença entre os mesmos. A composição desses meios de cultivo está apresentada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Composição do meio de cultivo

Composto	Fornecedor	Massa (g)
Óleo de castanha-do-Brasil*	Sinergia Científica	30
Peptona de soja	KASVI	30
Licor de Milho	Sigma-Aldrich	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Dinâmica	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dinâmica	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinâmica	4
CaCO <sub>3</sub>	Dinâmica	3

\*Glicose ou óleo de coco

No preparo do meio de cultivo, os reagentes sólidos da Tabela 3.3 foram solubilizados em 1000 mL de água destilada, sendo o pH do meio ajustado para 7,2. Em seguida, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados 225 mL do meio líquido estéril e 25 mL do inóculo a cada um dos dois *erlenmeyers* utilizados na fermentação. O processo fermentativo foi realizado em duplicata, sendo conduzido em *shaker* a 28 °C e 130 rpm durante 7 dias. A cada 24 h foram coletadas amostras de 10 mL de cada *erlenmeyer* com o intuito de quantificar a produção do fármaco ao longo do processo.

### 3.3. Preparo das amostras e quantificação do fármaco

A cada uma das amostras coletadas foram adicionados 10 mL de acetona a fim de interromper a fermentação. Em seguida, o fermentado foi filtrado em papel filtro (INLAB tipo 10, porosidade 3 µm) utilizando uma bomba à vácuo (EOS, modelo VE18010). A biomassa gerada ficou retida no papel filtro, o qual havia sido previamente pesado. Após a filtração os papéis de filtro contendo a biomassa gerada foram mantidos em estufa a 60 °C durante 24 h. Essa temperatura foi escolhida a fim de manter as propriedades do material gerado durante a fermentação. Decorrido esse tempo, os papéis foram pesados novamente, e assim pôde-se verificar quantidade de biomassa gerada durante a fermentação.

O filtrado foi evaporado em um evaporador rotativo (FISATON 803) até que se verificasse a formação de um material escuro e viscoso. A esse material foram adicionados 3,5 mL de fase móvel, a qual era composta por acetonitrila e água em uma proporção (70:30). Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10 °C (centrífuga Hettich 420R) e o sobrenadante foi coletado e utilizado para a quantificação do tacrolimo.

A quantificação do fármaco foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). Para isso, foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, com o comprimento de onda ajustado para 210 nm. Foram feitas injeções de 20 µL de amostra, sendo a temperatura do processo mantida a 60 °C com a ajuda de um banho termostático (QUIMIS – Q214M2). A fase móvel era composta por acetonitrila e água em uma proporção 70:30 e a vazão foi mantida a 1 mL/min durante todo o processo. A coluna utilizada como fase estacionária foi a Phenomenex Luna C18. A concentração do sobrenadante obtida por meio da análise em HPLC foi convertida na concentração da amostra de acordo com a Equação 1.

$$C_{amostra} = \frac{C_{sobrenadante} \times V_{sobrenadante}}{V_{amostra}} \quad (1)$$

Em que as concentrações da amostra e do sobrenadante são dadas em mg/L e os volumes da amostra e do sobrenadante dados em L.

A curva analítica para quantificação do tacrolimo foi construída seguindo a instrução normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O padrão de tacrolimo utilizado foi adquirido junto a Sigma-Aldrich (CAS 109581-93-3, pureza  $\geq 98$  %). As concentrações previamente definidas foram 30, 60, 90, 120 e 150 mg/L. Essa curva está representada na Figura 3.1, sendo seu coeficiente de determinação igual a 0,9992. A equação da reta dessa curva é dada por  $y = 7 \times 10^{-5}x - 0,59$ .

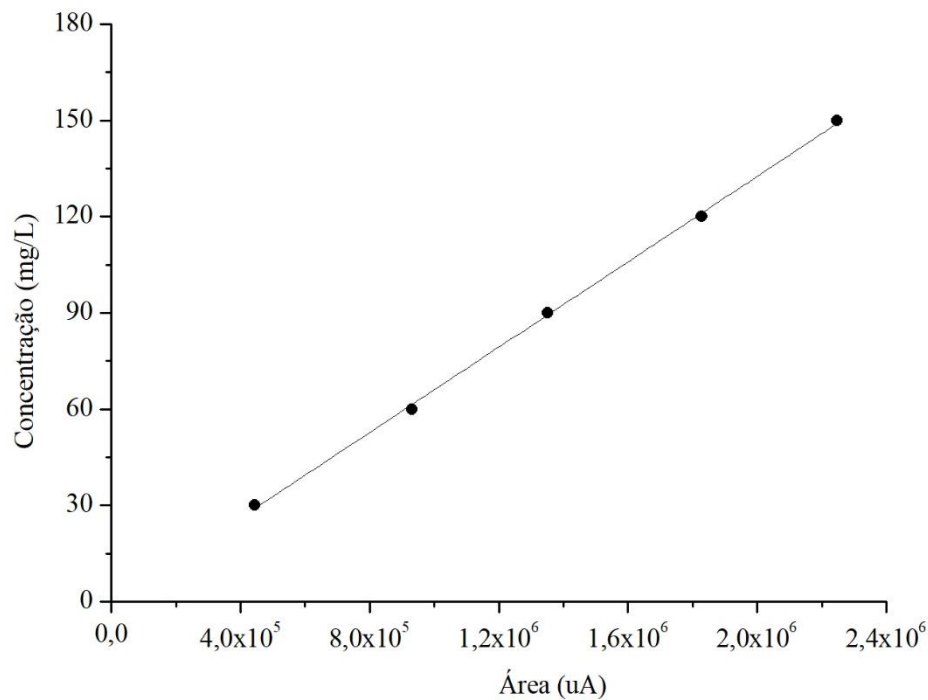


Figura 3.1 – Curva analítica do tacrolimo

### 3.4. Quantificação de proteínas e açúcares redutores

#### 3.4.1. Quantificação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson

Para a determinação de açúcares redutores foi utilizado o método de Somogyi-Nelson, seguindo o protocolo fornecido pela Embrapa (Comunicado Técnico 86). Nesse método, o óxido cuproso é obtido por meio do aquecimento do açúcar com uma solução alcalina de tartarato de cobre. Esse óxido reage com o molibdato de arsênio, produzindo uma substância de coloração azul, a qual pode ser quantificada colorimetricamente (DEMIATE *et al.*, 2002). O primeiro passo para a realização desse método é a preparação dos reagentes de Somogyi-Nelson I e II (SN-I e SN-2). As Tabela 3.4 e 3.5 relacionam as substâncias utilizadas com suas respectivas concentrações

Tabela 3.4 – Reagentes utilizados para a preparação do reagente SN-I

Composto	Fornecedor	Proporção (g)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Synth	4

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Dinâmica	24
$\text{NaHCO}_3$	Dinâmica	16
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Dinâmica	12
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Dinâmica	18

Tabela 3.5 – Reagentes utilizados para a preparação do reagente SN-II

<b>Composto</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Proporção (g)</b>
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Dinâmica	50
$\text{H}_2\text{SO}_4$	ECIBRA	42*
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4$	Sigma-Aldrich	6

\*mL

Para o preparo do reagente SN-I, os compostos da Tabela 3.4 foram dissolvidos em 600 mL de água destilada, sendo o volume do balão volumétrico de 1 L completado até o menisco. Deixou-se a solução em repouso durante um dia sem o contato com a luz. Em seguida, a solução foi filtrada e armazenada em frasco âmbar. O reagente SN-II foi feito através da mistura de duas soluções, conhecidas como solução A e solução B. No preparo da solução A, 50 g de molibdato de amônio anidro foram dissolvidos em 900 mL de água destilada. Em seguida, à essa solução foram adicionados lentamente 42 mL de ácido sulfúrico concentrado. Já a solução B foi preparada através da dissolução de 6 g de arseniato dibásico de sódio anidro em 50 mL de água destilada. Por fim, as soluções A e B foram misturadas e deixadas em repouso durante 24 h a 37 °C.

Depois de preparados os reagentes SN-I e SN-II, iniciou-se o método propriamente dito. Para isso, foi pipetado 1 mL da amostra recolhida durante a fermentação em um tubo de ensaio, e a essa amostra foram adicionados 2 mL do reagente SN-I. Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex, aquecidas em banho maria durante 6 minutos e resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. Foram adicionados 2 mL de reagente SN-II a cada tubo de ensaio, sendo estes agitados em vórtex e deixados em repouso durante 5 minutos. Por fim, adicionou-se 25 mL de água destilada às amostras e fêz-se as medidas das absorbâncias em espectrofotômetro UV-vis com comprimento de onda de 540 nm. O teste foi realizado em duplicata.

A curva analítica do método de Somogyi-Nelson foi construída utilizando uma solução padrão de glicose, sendo escolhidas as seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300, 400 e 500

mg/L. Essa curva está representada na Figura 3.2, sendo seu coeficiente de determinação igual a 0,9982. A equação da reta que representa essa curva é dada por  $y = 673,17x - 0,84$ .

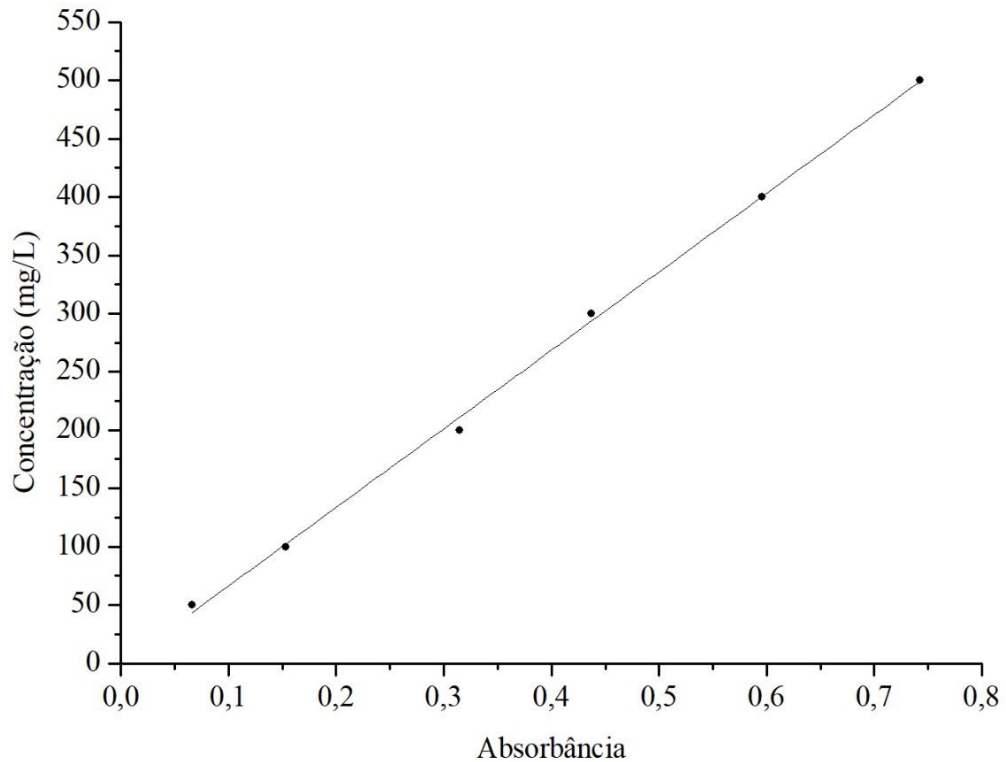


Figura 3.2 – Curva analítica de açúcares redutores

### 3.4.2. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

As proteínas totais foram quantificadas através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Esse ensaio foi conduzido em duplicata. Inicialmente, foram pipetados 100  $\mu$ L de cada amostra em tubos de ensaio. Em seguida, a cada tubo de ensaio foram adicionados 100  $\mu$ L de NaOH (1N) e 2,5 mL do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). Por fim, as misturas foram agitadas em vórtex e deixadas em repouso durante 20 minutos. Ao fim desse tempo, cada amostra foi lida em um espectrofotômetro UV-vis utilizando um comprimento de onda de 595 nm.



A curva analítica do método de Bradford foi construída utilizando albumina bovina como padrão. Foram utilizadas concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/L. Essa curva está representada na Figura 3.3, sendo seu coeficiente de determinação igual a 0,9687. A equação da reta que representa essa curva é  $y = 591,09x + 1,74$ .

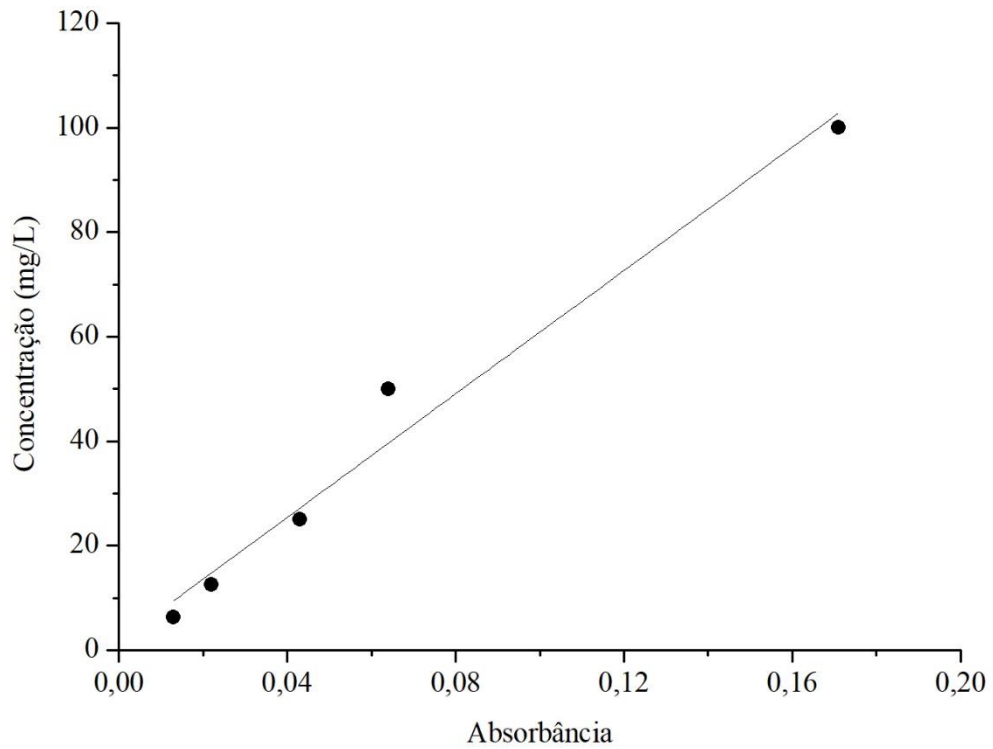


Figura 3.3 – Curva analítica de proteínas

# CAPÍTULO 4

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Esse capítulo aborda os resultados obtidos nas fermentações realizadas utilizando como fonte de carbono a glicose, o óleo de coco e o óleo de castanha-do-Brasil, bem como discute as hipóteses que explicam esses resultados. É importante lembrar que os três processos fermentativos foram conduzidos sob as mesmas condições de temperatura e rotação (28 °C e 130 rpm, respectivamente). Além disso, é apresentada uma análise crítica dos resultados obtidos, a qual nos ajuda a definir qual seria a melhor fonte de carbono na fermentação da *Streptomyces tsukubaensis* visando o aumento da produção do tacrolimo.

### 4.1. Avaliação da produção global e específica de tacrolimo

O caldo fermentado foi produzido utilizando o mesmo meio de fermentação proposto por Turlo *et al.* (2012), entretanto, uma vez que houve a alteração da fonte de carbono, foi necessário uma adaptação da concentração utilizada, a qual foi baseada em Singh e Behera (2009). Esse cuidado é necessário, uma vez que uma alta concentração de carbono no meio pode inibir a produção de metabólitos secundários, comprometendo assim a produção de tacrolimo (JONES e PORTER, 1998). O fornecimento de fontes de carbono que são facilmente assimiláveis permite o crescimento rápido da *Streptomyces tsukubaensis* no meio de cultura, não prejudicando assim a produção do tacrolimo (ORDÓÑEZ-ROBLES *et al.*, 2018).

O uso de óleos vegetais como fontes de carbono na fermentação para a produção do tacrolimo já havia sido reportado pela literatura (KIM *et al.*, 2007; SINGH E BEHERA, 2009; MISHRA E VERMA, 2012). No trabalho em questão, foram utilizados os óleos de coco e de

castanha-do-Brasil com o intuito de estimular a tropicalização do produto e diminuir a dependência de óleos importados, resultando em uma redução no custo do fármaco.

A Figura 4.1 mostra os perfis das fermentações utilizando os três meios fermentativos. Os resultados descritos pela literatura que utilizaram a *Streptomyces tsukubaensis* para a produção do tacrolimo reportam uma produção máxima do fármaco entre 96 e 168 h (JUNG *et al.*, 2009; SINGH E BEHERA, 2009; WANG *et al.*, 2017b; LI *et al.*, 2019). No trabalho em questão, para as três fontes de carbono analisadas, as maiores concentrações de fármaco foram obtidas entre 96 e 120 horas. No geral, em meios de cultura líquidos, a produção de metabólitos secundários ocorre durante a fase estacionária, ponto em que as divisões celulares diminuem e as taxas de crescimento e de morte bacteriana se igualam (BIBB, 2005; BLACK, 2008). A redução da concentração de tacrolimo no meio aconteceu a partir de 120 h. Isso acontece, porque com o passar do tempo, a quantidade de nutrientes disponíveis no meio diminui, sendo que as células bacterianas perdem sua capacidade de se dividirem e produzirem metabólitos, resultando em morte celular (BLACK, 2008).

É possível observar que o óleo de castanha-do-Brasil foi a fonte de carbono cuja fermentação produziu maior concentração de tacrolimo (41,67 mg/L), sendo atingida em 96 h. A maior concentração do fármaco obtida utilizando óleo de coco aconteceu no mesmo período, porém alcançando um valor de 31,35 mg/L. Já a maior concentração de FK506 produzida utilizando a glicose foi igual a 22,88 mg/L, sendo atingida em 120 h.

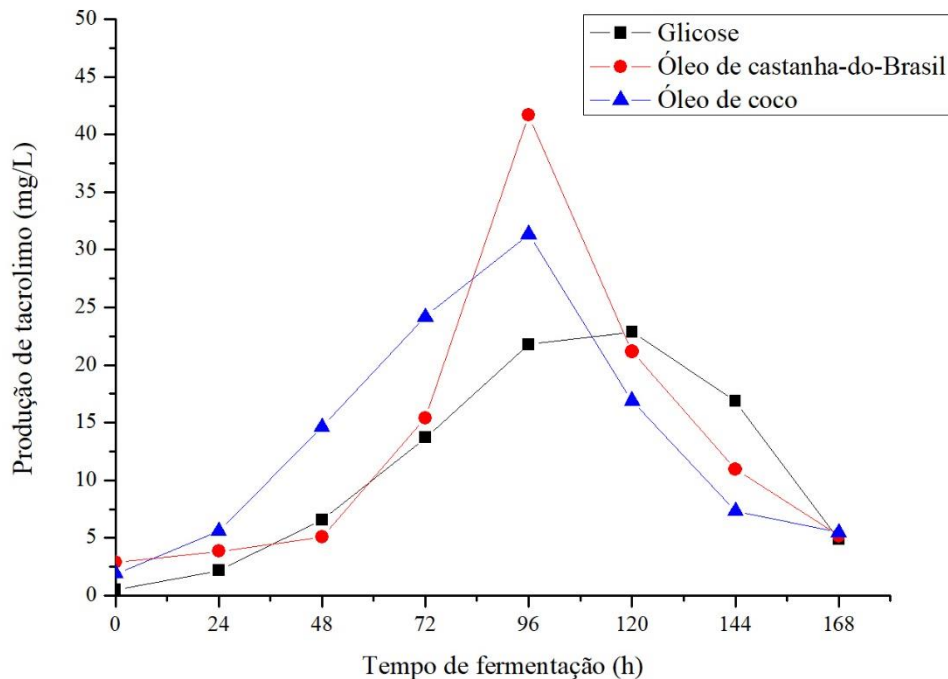


Figura 4.1 – Produção de tacrolimo ao longo de 168h utilizando fontes distintas de carbono

Sabe-se que o óleo de castanha-do-Brasil é uma substância rica em ácidos graxos insaturados, cujas cadeias carbônicas são mais facilmente quebradas durante o metabolismo microbiano (ANDREOTTI, 1995; BLACK, 2008). Em contrapartida, o óleo de coco é composto majoritariamente por ácidos graxos saturados, como o ácido laurico, os quais não são facilmente assimilados pela bactéria, prejudicando assim a produção de metabólitos secundários como o tacrolimo (GUNSTONE, 2011).

Com base em fermentações conduzidas em trabalhos anteriores (SINGH e BEHERA, 2009; MISHRA e VERMA, 2012; XIA *et al.*, 2013), é possível perceber que os óleos vegetais ricos em ácido linoléico, como é o caso do óleo de soja, óleo de algodão, óleo de amendoim e óleo de girassol (GUNSTONE, 2011), demonstraram grande potencial para serem usados como fontes de carbono em fermentações utilizando a *Streptomyces tsukubaensis*. O óleo de castanha-do-Brasil tem aproximadamente 31,4% de ácido linoleico em sua composição, enquanto o óleo de coco apresenta apenas 3,6%, o que sugere que tal substância pode atuar como um precursor do tacrolimo, ajudando a entender porque o óleo de castanha-do-Brasil teve maior sucesso na produção de fármaco que o óleo de coco.

Apesar de ser amplamente utilizada como fonte de carbono em fermentações, a glicose é assimilada rapidamente pela bactéria, dando suporte à fermentação principalmente durante a fase de crescimento (SANCHEZ *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-CASTRO *et al.*, 2013). Por esse motivo, muitas vezes a quantidade dessa substância disponível no meio de fermentação durante a fase de produção não é suficiente, prejudicando a produção de metabólitos. Uma alternativa para solucionar esse problema seria o aumento da concentração de glicose disponível no meio de fermentação, no entanto, a presença desse açúcar em altas concentrações diminui a produção de metabólitos secundários como o tacrolimo (SANCHEZ *et al.*, 2010). Por fim, a utilização dessa substância como fonte de carbono pode desencadear a repressão catabólica de carbono (CCR), culminando na diminuição da produção do fármaco (SANCHEZ e DEMAIN, 2002).

A quantidade de biomassa produzida também foi monitorada ao longo dos processos fermentativos. Os perfis de biomassa encontrados estão representados na Figura 4.2.

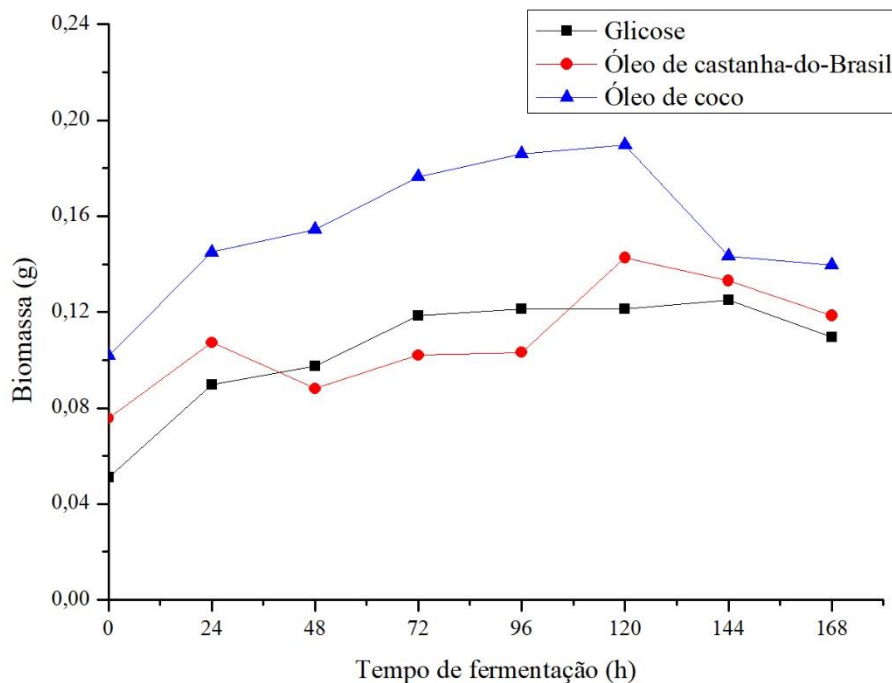


Figura 4.2 – Biomassa produzida ao longo dos processos fermentativos utilizando diferentes fontes de carbono

Pode-se dizer que parte da biomassa gerada nas fermentações ilustradas na Figura 4.2 teve sua produção intensificada graças à presença da peptona de soja no meio de fermentação. A literatura reporta que a presença dessa substância, que é a principal fonte de nitrogênio presente no meio, aumenta a produção de biomassa durante o processo, podendo ser substituída pelo sulfato de amônio (MARTÍNEZ-CASTRO *et al.*, 2013).

Comparando os perfis de biomassa ao longo da fermentação, é possível notar que os processos fermentativos conduzidos utilizando óleos vegetais como fontes de carbono produziram uma maior quantidade de biomassa quando comparado à fermentação conduzida utilizando glicose, o que está de acordo com o trabalho de Wang *et al.* (2017b), o qual avaliou a eficiência do óleo de soja na suplementação da fermentação da *Streptomyces tsukubaensis* para produção de FK506. O uso de óleos em fermentações faz com que o metabolismo de carbono da bactéria seja mais robusto, resultando em uma maior produção de biomassa (Wang *et al.*, 2017b).

A produção específica (também conhecida como produtividade) é um indicador importante no processo de fermentação do tacrolimo, uma vez que a produção de grande quantidade de biomassa significa uma maior dificuldade na purificação, o que acaba influenciando diretamente na pureza de fármaco alcançada. A mesma é definida por:

$$\text{Produção específica} = \frac{\text{Concentração do fármaco}}{\text{Biomassa}} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo: Concentração do fármaco= mg/L

Biomassa produzida= g/L

Produção específica = mg/g

A Figura 4.3 representa a produção específica de FK506 ao longo do tempo.

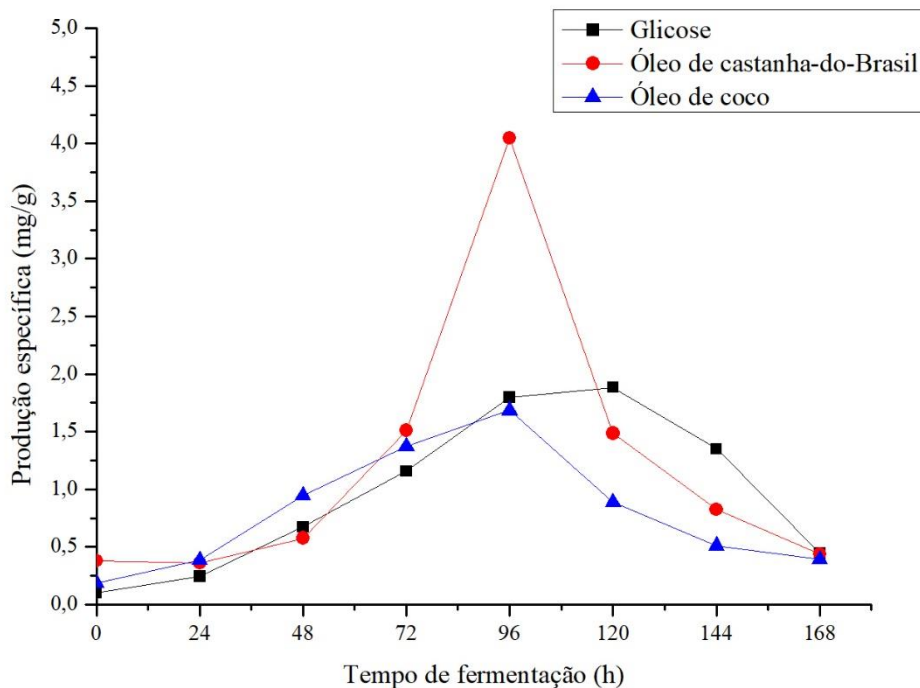


Figura 4.3 – Produção específica de tacrolimo ao longo da fermentação

Através da Figura 4.3 é possível perceber que a maior produção específica alcançada foi utilizando o óleo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono, sendo esta igual a 4,06 mg/g. Esse resultado é próximo ao valor da produção específica relatada por Singh e Behera (2009), utilizando óleo de algodão como fonte de carbono. Por outro lado, as maiores produções específicas atingidas pela glicose e pelo óleo de coco foram iguais a 1,88 e 1,68 mg/g, respectivamente. Dessa forma, apesar do óleo de coco ter uma produção de tacrolimo maior que a glicose, o mesmo também produz uma maior quantidade de biomassa, o que acarreta na diminuição da produção específica do fármaco.

#### 4.2. Variação do pH ao longo do processo fermentativo

As *Streptomyces* são bactérias encontradas no solo e que geralmente, preferem viver em ambientes de pH na faixa de 6,5 a 8 (KUTZNER, 1981). Em trabalhos anteriores, os valores de pH adotados em fermentações utilizando a *Streptomyces tsukubaensis* variam de 7 a 7,2 (MO *et al.*, 2009; MISHRA E VERMA, 2012; HUANG *et al.*, 2013). No estudo em questão, foi

adotado um pH de 7,2 para todos os três meios fermentativos, seguindo a mesma estratégia utilizada por Turlo *et al.* (2012). É importante destacar que o pH é de extrema importância para a produção do tacrolimo, uma vez que a produção do mesmo é favorecida em valores de pH baixos e estáveis (LI *et al.*, 2019).

A Figura 4.4 mostra as variações de pH em cada meio fermentativo ao longo do tempo.

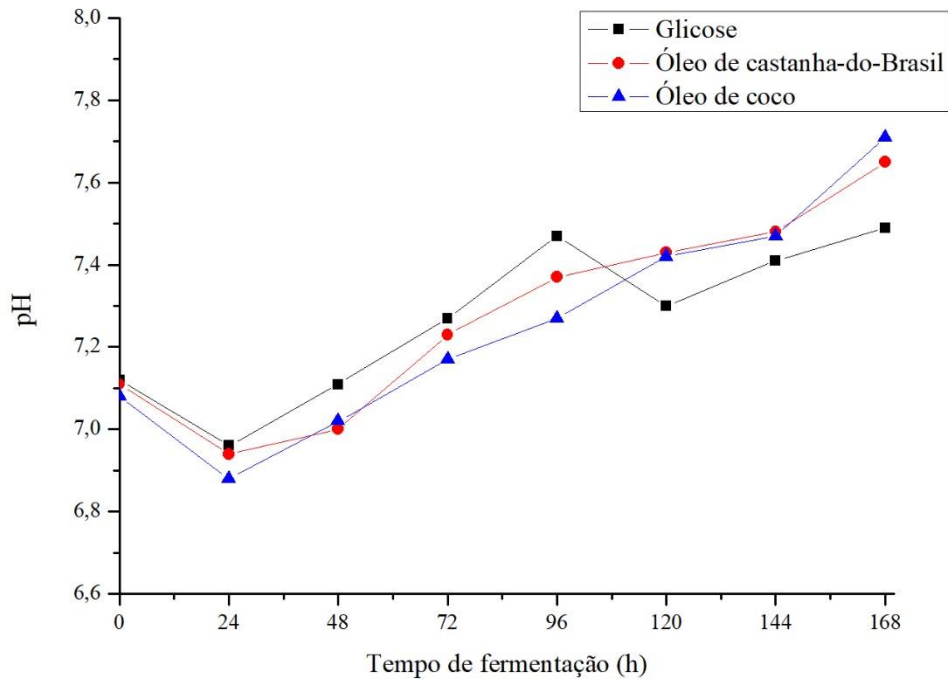


Figura 4.4 – Variação do pH durante as fermentações

Percebe-se que nas primeiras 24 h há diminuição do pH, seguida por um aumento gradativo, sendo que em 168 h, os valores de pH medidos foram 7,49; 7,65 e 7,71 (fermentações cujas fontes de carbono foram glicose, óleo de castanha-do-Brasil e óleo de coco, respectivamente). A redução do valor do pH no início do processo fermentativo acontece graças à produção de ácidos orgânicos pela *Streptomyces tsukubaensis*, os quais são consumidos ao longo da fermentação (LI *et al.*, 2019). Em contrapartida, o aumento dessa variável ao longo do tempo é justificado pelo fato de que durante o metabolismo da bactéria são produzidas várias substâncias, entre elas a amônia, provocando o aumento do pH (KIM *et al.*, 2000). Os perfis de pH apresentados na Figura 4.4 condizem com os resultados reportados pela literatura (WANG *et al.*, 2017b; LI *et al.*, 2019).



### 4.3. Quantificação de açúcares redutores e proteínas

Também foi realizada a quantificação de açúcares redutores e proteínas ao longo das fermentações. A avaliação desses parâmetros é importante, já que tais substâncias estão presentes no caldo fermentado e interferem diretamente na purificação do fármaco. A Figura 4.5 apresenta o perfil de concentração de açúcares redutores ao longo da fermentação.

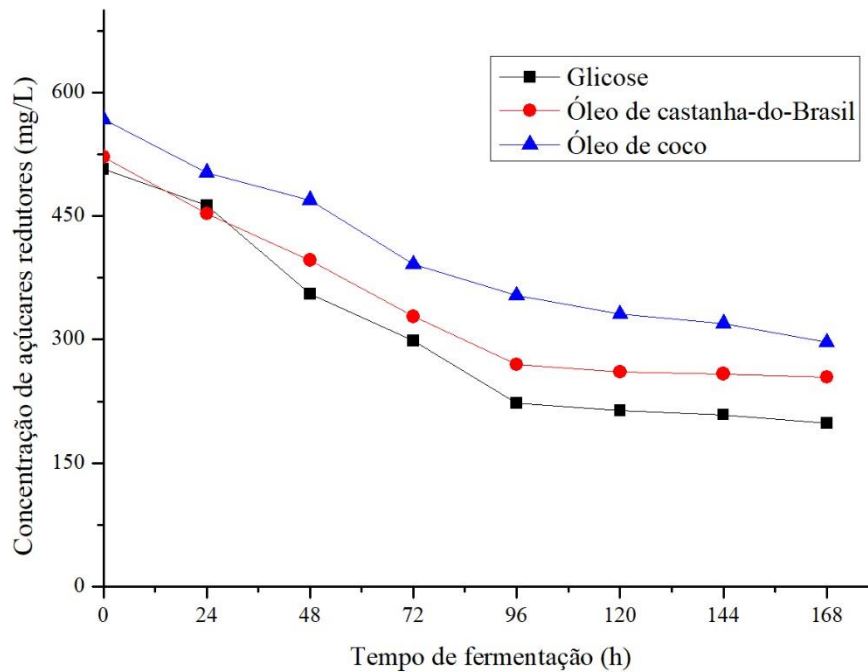


Figura 4.5 – Concentração de açúcares redutores ao longo das fermentações utilizando três fontes de carbono distintas

Nos três casos analisados, a quantidade de açúcares redutores cai ao longo da fermentação, o que coincide com os resultados reportados na literatura (KIM et al., 2007; HUANG *et al.*, 2013). A maior queda ocorre nas primeiras 72 h, correspondendo à fase exponencial, a qual é caracterizada por intenso crescimento celular e atividade metabólica (BLACK, 2008). Também é possível perceber que durante a fase de crescimento, não houve um aumento considerável da produção de biomassa, o que sugere que a quantidade de açúcares consumida durante essa fase foi utilizada principalmente para a biossíntese do tacrolimo (DU *et al.*, 2014). Nota-se que a glicose é a fonte de carbono que é consumida com maior facilidade, o que já era previsto pela literatura (SANCHEZ *et al.*, 2010). Ao final da fermentação, o meio

utilizando o óleo de coco foi o que conteve maior quantidade de açúcares redutores, alcançando uma concentração final de 296,36 mg/L. Também foi monitorado o perfil da concentração de proteínas, o qual está representado na Figura 4.6.

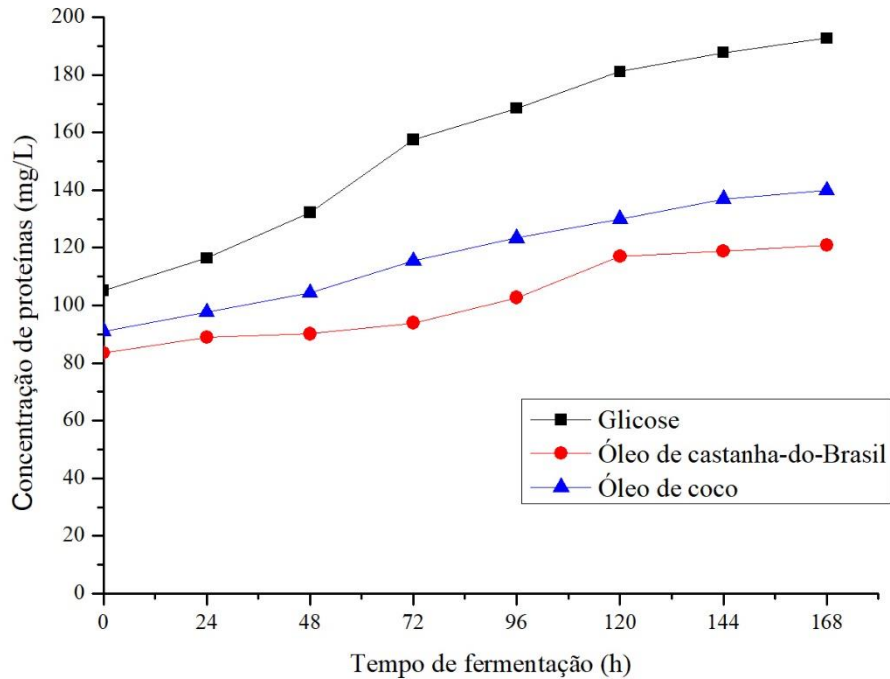


Figura 4.6 – Concentração de proteínas ao longo das fermentações utilizando três fontes de carbono distintas

A Figura 4.6 revela que a quantidade de proteínas presentes no meio de fermentação aumentou durante os três processos fermentativos. O meio que utilizou a glicose como fonte de carbono foi o que obteve maior concentração de proteínas ao final do processo (192,71 mg/L), o que é um gargalo para a posterior purificação do fármaco. O maior aumento da concentração de proteínas presentes no meio que utilizou o óleo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono aconteceu entre 96 e 120 h, coincidindo o período em que ocorreu a queda da produção de tacrolimo. Esse comportamento não foi observado nas fermentações que utilizaram a glicose e o óleo de coco como fontes de carbono.

# CAPÍTULO 5

## 5. CONCLUSÃO

---

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da glicose, do óleo de castanha-do-Brasil e óleo de coco como fontes de carbono para a produção de tacrolimo utilizando a *Streptomyces tsukubaensis*.

Foram utilizados três diferentes meios de fermentação para a produção de tacrolimo, sendo que a diferença entre os mesmos era a fonte de carbono fornecida para a *Streptomyces tsukubaensis*. O meio de fermentação que utilizou o óleo de castanha-do-Brasil foi o considerado o mais eficiente, uma vez que obteve a maior produção de tacrolimo (41,67 mg/L), além de atingir uma produção específica de 4,06 mg/g, a qual é bastante próxima às produções específicas reportadas pela literatura. Acredita-se que o ácido linoleico, presente em grandes quantidades no óleo de castanha-do-Brasil, agiu como precursor do tacrolimo durante a fermentação. O meio de fermentação que utilizou óleo de coco como fonte de carbono chegou a uma produção máxima de tacrolimo igual a 31,35 mg/L, enquanto o meio que utilizou a glicose como fonte de carbono alcançou um valor máximo de 22,88 mg/L. Verificou-se também que o meio que produziu maior quantidade de biomassa foi o que utilizou o óleo de coco como fonte de carbono, o que diminuiu a produção específica de tacrolimo e faz com que o processo de purificação seja dificultado.

Em todos os meios de fermentação avaliados a quantidade de proteínas aumentou com o passar do tempo, sendo que a fermentação que utilizou glicose como fonte de carbono foi a que produziu maior quantidade de proteínas, atingindo uma concentração de 192,71 mg/L ao fim do processo (168 h). Com relação à quantidade de açúcares presentes no meio, a concentração dessas substâncias diminuiu ao longo do processo fermentativo, o que condiz com os resultados reportados pela literatura. A fermentação que utilizou óleo de coco como fonte de

carbono foi a que teve maior concentração de açúcares ao fim do processo, chegando a um valor de 296,36 mg/L.

### 5.1. Sugestão para trabalhos futuros

- Repetição da fermentação utilizando óleo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono em um biorreator a fim de ter um controle maior de variáveis e verificar se há um aumento considerável na produção de tacrolimo;
- diminuir a concentração inicial de óleo de castanha-do-Brasil e examinar o resultado da suplementação do mesmo no início da fase estacionária (aproximadamente 72 h) da *Streptomyces tsukubaensis*;
- monitorar a produção de tacrolimo com mais frequência no período entre 96 e 120 h, a fim de verificar em que momento é atingida a concentração máxima de fármaco;
- explorar o uso de outros óleos vegetais nacionais que sejam ricos em ácido linoleico como fontes de carbono na fermentação utilizando a *Streptomyces tsukubaensis*;
- verificar as vitaminas e minerais presentes nos óleos vegetais utilizados na fermentação;
- realizar um estudo econômico avaliando o custo da produção de tacrolimo utilizando o óleo de castanha-do-Brasil a fim de otimizar o processo;
- substituir o uso da peptona de soja por outras substâncias como o sulfato de amônio, o qual é uma fonte de nitrogênio, mas não fornece carbono para o meio fermentativo e não estimula a produção de biomassa.

## REFERÊNCIAS

ABIOVE. Planilhas com a capacidade de processamento, refino e envase de óleos vegetais no Brasil. Disponível em: <<http://abiove.org.br/estatisticas/>>. Acesso em 18 de agosto de 2019

Agência Brasil. Farmanguinhos começa a produzir remédio para transplantados. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/pesquisa-e-inovacao/noticia/2018-04/farmanguinhos-comeca-produzir-remedio-para-transplantados>>. Acesso em 19 de agosto de 2019

Agência Fiocruz de notícias. Fiocruz distribui medicamento para transplantados no SUS. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/fiocruz-distribui-medicamento-para-transplantados-no-sus>> Acesso em 19 de agosto de 2019.

AHARONOWITZ, Yair; DEMAIN, Arnold L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, n. 2, p. 159-164, 1978.

AKASHI, Takeshi et al. 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, Abdulrahman Mohammed et al. Long-term use of 0.003% tacrolimus suspension for treatment of vernal keratoconjunctivitis. **Oman Journal of Ophthalmology**, v. 10, n. 3, p. 145, 2017.

AMAYA, Tadahiro; HIROI, Jun; LAWRENCE, Ira D. Tacrolimus and other immunosuppressive macrolides in clinical practice. In: **Macrolide Antibiotics**. Academic Press, 2003. p. 421-452.

ANDREOTTI, Carlos M. A cultura da Castanha do Brasil. **Coleção Plantar, Série Vermelha-Fruteira**, v. 23, 1995.

ARORA, Charan Jeet et al. The efficacy and safety of tacrolimus as mono-and adjunctive therapy for vitiligo: A systematic review of randomised clinical trials. **Australasian Journal of Dermatology**, 2019.

ARUNSASI, M. et al. Submerged fermentation of amylase enzyme by *Aspergillus flavus* using *Cocos nucifera* meal. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 6, n. 2, p. 75-87, 2010.

Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO). Registro Brasileiro de Transplantes (1º trimestre de 2019). Disponível em:

<<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2019/RBT-2019-1%20trim%20-%20Pop.pdf>>. Acesso em 21 de agosto de 2019.

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

BASTIDA, Jesús et al. Treatment of folliculitis decalvans with tacrolimus ointment. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 2, p. 216-220, 2012.

BIBB, Mervyn J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 208-215, 2005.

BLACK, Jacquelyn G. Microbiology: principles and explorations. John Wiley & Sons, 2008.

BRADFORD, Marion 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.

BURNETT, Christina L. et al. Final report on the safety assessment of Cocos nucifera (coconut) oil and related ingredients. **International Journal of Toxicology**, v. 30, n. 3\_suppl, p. 5S-16S, 2011.

CATHER, Jennifer Clay; ABRAMOVITS, William; MENTER, Alan. Cyclosporine and tacrolimus in dermatology. **Dermatologic clinics**, v. 19, n. 1, p. 119-137, 2001.

CAVALIÉ, Marine et al. Maintenance therapy of adult vitiligo with 0.1% tacrolimus ointment: A randomized, double blind, placebo-controlled study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 970-974, 2015.

CHAN, Edward; ELEVITCH, Craig R. Cocos nucifera (coconut). **Species profiles for Pacific Island agroforestry**, v. 2, p. 1-27, 2006.

COHEN, DAVID J. et al. Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. **Ann Intern Med**, v. 101, n. 5, p. 667-682, 1984.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto Leite; BONATO, Pierina Sueli. Fundamentos de cromatografia. 2006.

CORREIA, Iara Michelle Silva et al. Avaliação das potencialidades e características físico-químicas do óleo de Girassol (*Helianthus annuus* L.) e Coco (*Cocos nucifera* L.) produzidos no Nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

COSTA, Cassia Kely Favoretto; BALBINOTTO NETO, Giacomo; SAMPAIO, Luciano Menezes Bezerra. Eficiência dos estados brasileiros e do Distrito Federal no sistema público de transplante renal: uma análise usando método DEA (Análise Envoltória de Dados) e índice de Malmquist. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 1667-1679, 2014.

COSTA, Siddhartha GVAO et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.

COX, Kenneth L.; FREESE, Deborah K. Tacrolimus (FK506): the pros and cons of its use as an immunosuppressant in pediatric liver transplantation. **Clinical and investigative medicine**, v. 19, n. 5, p. 389-392, 1996.

DA CRUZ, Sandra Helena; CILLI, Eduardo Maffud; ERNANDES, José Roberto. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 1, p. 54-61, 2002.

DAHAL, Bibha et al. Diversity of free-living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota. **Microbiological Research**, v. 195, p. 31-39, 2017.

DE LIMA PROCÓPIO, Rudi Emerson et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466-471, 2012.

DEMIATE, Ivo Mottin *et al.* Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos: comparação entre método colorimétrico e titulométrico. 2002.

DE TRAN, Quang Hieu et al. Tacrolimus in dermatology. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery: Incorporating Medical and Surgical Dermatology**, v. 5, n. 4, p. 329-335, 2001.

DEMAIN, ARNOLD L. Genetic regulation of fermentation organisms. In: **Stadler Genet. Symp.** 1976. p. 41-55.

DU, Wenjie et al. Improved FK506 production by the precursors and product-tolerant mutant of *Streptomyces tsukubaensis* based on genome shuffling and dynamic fed-batch strategies. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1131-1143, 2014.

Extra Classe. Medicamentos para transplantados continuam em falta no estado. Disponível em: <https://www.extraclasse.org.br/saude/2019/07/medicamentos-para-transplantados-continuam-em-falta-na-farmacia-do-estado/>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

FERRARI, Wilson Murilo Correa da Silva *et al.* Recuperação e purificação de tacrolimo proveniente de streptomyces tsukubaensis. 2018.

Folha de São Paulo. Falta medicamento de alto custo, diz Leitor. Disponível em: <<https://agora.folha.uol.com.br/grana/2019/03/falta-medicamento-de-alto-custo-diz-leitor.shtml>>. Acesso em 19 de agosto de 2019

Folha de São Paulo. Ministério atrasa envio de remédio a pacientes com câncer e transplantados. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2017/09/1920500-ministerio-atrasa-envio-de-remedio-a-pacientes-com-cancer-e-transplantados.shtml>>. Acesso em 19 de agosto de 2019

FUNG, John J. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. **Transplantation**, v. 77, n. 9, p. S41-S43, 2004.

GARCIA, Solange Cristina et al. Cyclosporine A and tacrolimus: a review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393-401, 2004.

GARCIA, V. D. História dos transplantes no Brasil.[on line] 2002.

GIOIELLI, Luiz Antonio. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 211-232, 1996.

GORANOVIČ, Dušan et al. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in Streptomyces tsukubaensis. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 238, 2012.

GRIMES, Pearl E. et al. Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 1, p. 52-61, 2004.

GRIMES, Pearl E.; SORIANO, Teresa; DYTOC, Marlene T. Topical tacrolimus for repigmentation of vitiligo. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 47, n. 5, p. 789-791, 2002.

GUNSTONE, Frank (Ed.). **Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses**. John Wiley & Sons, 2011.

HADDAD, Elizabeth et al. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. **Cochrane Database of systematic reviews**, n. 4, 2006.



HANAOKA, Kaori et al. Benefits of a loading dose of tacrolimus on graft survival of kidney transplants in nonhuman primates. **Transplant Immunology**, v. 52, p. 32-39, 2019.

HENRY, Mitchell L. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. **Clinical transplantation**, v. 13, n. 3, p. 209-220, 1999.

HESSEN, Michelle; AKPEK, Esen Karamursel. Dry eye: an inflammatory ocular disease. **Journal of ophthalmic & vision research**, v. 9, n. 2, p. 240, 2014.

Hoje em dia. Falta de medicamentos prejudica transplantados em Minas; espera chega a seis meses. Disponível em: <<https://www.hojeemdia.com.br/horizontes/cidades/falta-de-medicamentos-prejudica-transplantados-em-minas-espera-dura-at%C3%A9-seis-meses-1.721728>>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

HUANG, Di et al. 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.

JONES, A. M.; PORTER, M. A. Vegetable oils in fermentation: beneficial effects of low-level supplementation. **Journal of Industrial microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4-5, p. 203-207, 1998.

JORDAN, Mark L. et al. Long-term results of pancreas transplantation under tacrolimus immunosuppression. **Transplantation**, v. 67, n. 2, p. 266, 1999.

Jornal Nacional. Brasil tem recorde positivo: 27 mil transplantes realizados em 2017. Disponível em <<http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2018/03/brasil-tem-recorde-positivo-27-mil-transplantes-realizados-em-2017.html>>. Acesso em 19 de agosto de 2019.

JUNG, Sangwon et al. Process development for purifying tacrolimus from *Streptomyces* sp. using adsorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 6, p. 1208-1213, 2011.

JUNG, Sangwon et al. Strain development of *Streptomyces* sp. for tacrolimus production using sequential adaptation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1467, 2009.

KHAN, Shams Tabrez et al. *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 391-403, 2011.

KIM, Chang Joon; CHANG, Yong Keun; CHUN, Gie-Taek. Enhancement of Kasugamycin Production by pH Shock in Batch Cultures of *Streptomyces kasugaensis*. **Biotechnology progress**, v. 16, n. 4, p. 548-552, 2000.

KIM, Hyung Soo; PARK, Young In. Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 418-421, 2008.

KIM, Hyung-Soo et al. 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, Toru et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1256-1265, 1987.

KLINTMALM, Goran. A review of FK506: a new immunosuppressant agent for the prevention and rescue of graft rejection. **Transplantation Reviews**, v. 8, n. 2, p. 53-63, 1994.

KOBASHIGAWA, J. A. et al. Tacrolimus with mycophenolate mofetil (MMF) or sirolimus vs. cyclosporine with MMF in cardiac transplant patients: 1-year report. **American Journal of Transplantation**, v. 6, n. 6, p. 1377-1386, 2006.

Kutzner, H. J. "The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria". v. 2. p. 2028-2029, 1981.

LI, Chuan-Jiang; LI, Liang. Tacrolimus in preventing transplant rejection in Chinese patients—optimizing use. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 473, 2015.

LI, Yang et al. Enhancing the production of tacrolimus by engineering target genes identified in important primary and secondary metabolic pathways and feeding exogenous precursors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1-18, 2019.

LIN, C. Shirley et al. FK-506 and cyclosporin A inhibit highly similar signal transduction pathways in human T lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 133, n. 2, p. 269-284, 1991.

LIRAS, Paloma; VILLANUEVA, Julio R.; MARTÍN, Juan F. Sequential expression of macromolecule biosynthesis and candicidin formation in *Streptomyces griseus*. **Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 269-277, 1977.

MAGASANIK, Boris. Catabolite repression. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 249-256. 1961.

MAGASANIK, Boris. Classical and postclassical modes of regulation of the synthesis of degradative bacterial enzymes. In: **Progress in nucleic acid research and molecular biology**. Academic Press, 1976. p. 99-115.

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.

MARTIN, Juan Francisco. Control of antibiotic synthesis by phosphate. In: **Advances in Biochemical Engineering, Volume 6**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1977. p. 105-127.

MARTÍNEZ-CASTRO, Miriam *et al.* 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.

Ministério da Agricultura , Pecuária e Abastecimento. Produção de Oleaginosas no Brasil. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-precos/producao-de-oleaginosas-no-brasil.pdf/view>>. Acesso em 18 de agosto de 2019

Ministério da Saúde. Brasil aumenta doação de órgãos e bate recorde em transplantes. Disponível em:

<<http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/44442-brasil-aumenta-doacao-de-orgaos-e-bate-recorde-em-transplantes>>. Acesso em 19 de agosto de 2019.

MISHRA, Abha; VERMA, Sharad. Optimization of process parameters for tacrolimus (FK 506) production by new isolate of Streptomyces sp. using response surface methodology. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 4, 2012.

MO, SangJoon *et al.* 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.

MO, SangJoon *et al.* Application of a combined approach involving classical random mutagenesis and metabolic engineering to enhance FK506 production in Streptomyces sp. RM7011. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 3053-3062, 2013.

MOCHIZUKI, Manabu *et al.* A clinical trial of FK506 in refractory uveitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 115, n. 6, p. 763-769, 1993.

- MOREIRA, Jean Vinícius *et al.* Produção de tacrolimo via fermentação por *Streptomyces tsukubaensis*. 2018.
- MOSCOVICI, Bernardo K. . Clinical treatment of dry eye using 0.03% tacrolimus eye drops. **Cornea**, v. 31, n. 8, p. 945-949, 2012.
- MOSCOVICI, Bernardo Kaplan *et al.* Treatment of Sjögren's syndrome dry eye using 0.03% tacrolimus eye drop: Prospective double-blind randomized study. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 38, n. 5, p. 373-378, 2015.
- MULLER, C. H. et al. **A cultura da castanha-do-brasil**. EMBRAPA-SPI, 1994.
- NAMIKI, Y. et al. 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.
- NUNES, Sidemar Presotto. Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil. **Departamento de Estudos Sócio-Econômico Rurais**, n. 159, 2007.
- ORDÓÑEZ-ROBLES, María et al. *Streptomyces tsukubaensis* as a new model for carbon repression: transcriptomic response to tacrolimus repressing carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 22, p. 8181-8195, 2017.
- ORDÓÑEZ-ROBLES, María; SANTOS-BENEIT, Fernando; MARTÍN, Juan F. Unraveling nutritional regulation of tacrolimus biosynthesis in *Streptomyces tsukubaensis* through omic approaches. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 39, 2018.
- PATZER, Silke I.; BRAUN, Volkmar. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 426-435, 2010.
- PEGO-FERNANDES, Paulo Manuel; GARCIA, Valter Duro. Estado atual do transplante no Brasil. **Diagn. tratamento**, v. 15, n. 2, 2010.
- PESTANA, Jose Osmar Medina et al. O contexto do transplante renal no Brasil e sua disparidade geográfica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2011.
- PETERKA, Tanja Rozman et al. 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.

Portal Federativo. SUS amplia lista de medicamentos ofertados. Disponível em: <<http://www.portalfederativo.gov.br/noticias/destaques/sus-amplia-lista-de-medicamentos-ofertados>>. Acesso em 19 de agosto de 2019

POSHEKHONTSEVA, V. Yu et al. Effect of Starch Composition on the Biosynthesis of Immunosuppressant Tacrolimus (FK-506) by *Streptomyces tsukubaensis* VKM Ac-2618D Strain. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 534-543, 2019.

RAHMAN, M. F. et al. Efficacy of topical tacrolimus in atopic dermatitis. **Journal of Pakistan Association of Dermatology**, v. 18, n. 2, p. 84-92, 2016.

Revista Veja. Pacientes que fizeram transplante denunciam falta de medicamentos. Disponível em: < <https://veja.abril.com.br/saude/pacientes-que-fizeram-transplante-denunciam-falta-de-medicamentos>>. Disponível em: 23 de agosto de 2019.

ROLS, J. L.; GOMA, G. Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil-in-water dispersions. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 1, p. 7-12, 1991.

ROMERO-RODRÍGUEZ, Alba et al. Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 162, 2017.

ROMERO-RODRÍGUEZ, Alba et al. Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 5, p. 761-781, 2018.

RUIZ, Beatriz et al. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

SANCHEZ, Sergio et al. Carbon source regulation of antibiotic production. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 442, 2010.

SANCHEZ, Sergio; DEMAIN, Arnold L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 895-906, 2002.

SHOUGHY, Samir S.; JAROUDI, Mahmoud O.; TABBARA, Khalid F. Efficacy and safety of low-dose topical tacrolimus in vernal keratoconjunctivitis. **Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)**, v. 10, p. 643, 2016.

SIEGL, Cornelia et al. Pharmacokinetics of topically applied tacrolimus dissolved in Marinosolv, a novel aqueous eye drop formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 134, p. 88-95, 2019.

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.

Sociedade Brasileira de Nefrologia. Posicionamento da área técnica do MS quanto à falta de imunossupressores. Disponível em : <https://sbn.org.br/posicionamento-da-area-tecnica-do-ms-quanto-a-falta-de-imunossupressores/>. Acesso em 23 de agosto de 2019.

SPIEKERKOETTER, Edda et al. **Use of fk506 for the treatment of pulmonary arterial hypertension**. U.S. Patent Application n. 16/198,242, 28 mar. 2019.

STAUNTON, James; WEISSMAN, Kira J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 380-416, 2001.

STÜLKE, Jörg; HILLEN, Wolfgang. Carbon catabolite repression in bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 2, p. 195-201, 1999.

Tacrolimo. Disponível em: <<https://www.libbs.com.br/sobre-nos/tacrolimo/>>. Acesso em 21 de agosto de 2019.

TANAKA, Hirokazu et al. Structure of FK506, a novel immunosuppressant isolated from Streptomyces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 16, p. 5031-5033, 1987.

TATEO, F. La composizione acidica della matiera estratta dai semi di Bertholletia excelsa. *Ind. Alim. Pinerolo*, v.10, n.2 p.68-70, 1971.

TURŁO, Jadwiga et al. Enhancement of tacrolimus productivity in Streptomyces tsukubaensis by the use of novel precursors for biosynthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 6-7, p. 388-395, 2012.

VENKATARAMANAN, Raman et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 29, n. 6, p. 404-430, 1995.

VINCENTI, Flavio et al. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. **Transplantation**, v. 73, n. 5, p. 775-782, 2002.

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

WANG, Cheng et al. Combining metabolomics and network analysis to improve tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* using different exogenous feedings. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 11, p. 1527-1540, 2017a.

WANG, Jun et al. 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, 2017b.

XIA, Menglei et al. 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.

XIONG, L.; LI, J.; KONG, F. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 32-37, 2004.

YOON, Yeo Joon; CHOI, Cha Yong. Nutrient effects on FK-506, a new immunosuppressant, production by *Streptomyces* sp. in a defined medium. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 6, p. 599-603, 1997.

ZENG, Qiang et al. Effects of tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil (MMF) on regulatory T cells and co-inhibitory receptors in the peripheral blood of human liver allograft patients. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 41, n. 3, p. 380-385, 2019.