



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

JEAN VINÍCIUS MOREIRA

PRODUÇÃO DE TACROLIMO VIA FERMENTAÇÃO POR

*Streptomyces tsukubaensis*

Campinas

2018

JEAN VINÍCIUS MOREIRA

PRODUÇÃO DE TACROLIMO VIA FERMENTAÇÃO POR  
*Streptomyces tsukubaensis*

TACROLIMUS PRODUCTION BY *Streptomyces tsukubaensis*  
FERMENTATION

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

*Orientador:* Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO JEAN VÍNICIUS MOREIRA,  
E ORIENTADA PELO PROFESSOR DOUTOR MARCO  
AURÉLIO CREMASCO.

Campinas  
2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES, 333017034 P8

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

M813p      Moreira, Jean Vinícius, 1986-  
Produção de tacrolimo via fermentação por *Streptomyces tsukubaensis* /  
Jean Vinícius Moreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

1. Tacrolimo. 2. Imunossupressão. 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:** Tacrolimus production by *Streptomyces tsukubaensis*  
fermentation

**Palavras-chave em inglês:**

Tacrolimus

Immunosuppression

Fermentation

*Streptomyces*

**Área de concentração:** Engenharia de Processos

**Titulação:** Doutor em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Cremasco [Orientador]

Gustavo Paim Valença

Marilda Mazzali

Marcio Caliar

Valeria Scorsato

**Data de defesa:** 07-02-2018

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

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta tese:

Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Profa. Dra. Marilda Mazzali

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Marcio Caliari

Instituição: Universidade Federal de Goiás (UFG)

Dra. Valeria Scorsato

Instituição: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais/Laboratório Nacional em Biociências (CNPEM/LNBio)

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

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente ao meu pai, Jorge Moreira, por todo o inventivo nestes anos, pelo apoio e encorajamento em todos os momentos.

À minha mãe e irmã, Sueli Maciel e Jéssica Moreira, pois sei que ambas torcem e esperam o meu melhor sempre. Espero nunca decepcioná-las.

Aos meus avós, Lauro e Maria Lopes de Souza, que são exemplos de vida e superação a seguir.

À Mayara Braga, por todos os bons momentos compartilhados, incentivo, e por ter sido sempre uma voz de apoio em tempos conturbados.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco pela oportunidade de trabalho ao longo de todos esses anos, por todo o tempo dispendido com leituras e correções. Minha formação acadêmica ganhou muito sob sua orientação.

Aos meus amigos que fizeram parte dessa caminhada. Sempre há o risco de esquecer alguém, porém seria injusto não nomeá-los: Ana Carolina Nascimento, Wilson Murilo, Rhelvis Oliveira, Rosely Cannavó e Dona Ida, Rodrigo Amaral, Helder Moura, Felipe Ferrari, Nicolý, Natália, Carlos Oliveira, Giselle Iokilevitc, Anna Iokilevitc, Aline Valentino, Elisandra Lagos, Elisangela Lagos, Gilmar Nunes e Anna Csoknyai Guimarães.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Telma Teixeira Franco, possibilitando esse trabalho por ter aberto as portas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renovável. Em especial, à Andrea Tamayo Peña por todo conhecimento, paciência e ajuda que me disponibilizou durante toda a parte experimental.

Aos membros do Team Valor Barão Geraldo, que me propiciaram bons momentos de descontração.

Ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, a todos os funcionários e funcionárias da FEQ e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

A todos que de uma forma ou de outra me ajudaram a chegar até aqui. Alguns com bons conselhos e outros, por vezes, com palavras de desânimo. Agradeço a todos da mesma forma e carinho.

*“May your hands always be busy  
May your feet always be swift  
May you have a strong foundation  
When the winds of changes shift  
May your heart always be joyful  
May your song always be sung  
May you stay forever young  
Forever young, forever young  
May you stay forever young”*

Bob Dylan

## RESUMO

O tacrolimo é um potente imunossupressor produzido por meio da fermentação por bactérias do gênero *Streptomyces*, sendo a *Streptomyces tsukubaensis* a primeira do gênero a comprovadamente produzir o tacrolimo. A maltose e a glicose foram avaliadas como fontes primárias de carbono neste trabalho, bem como a peptona de soja e licor íngreme de milho como fontes de nitrogênio. As fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas quanto à sua razão presentes no meio fermentativo. Ainda, com o intuito de avaliar o processo fermentativo, foram realizadas alterações de processo como, velocidade de agitação da incubadora (*shaker*) e temperatura de fermentação. As fermentações foram conduzidas em frascos *erlenmeyer* no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renováveis, as análises analíticas foram realizadas no Laboratório de Processos de Transferência de Massa do Departamento de Engenharia de Processos da Faculdade de Engenharia Química na Universidade Estadual de Campinas. Os resultados obtidos apontaram que a redução da temperatura inicial de 30 para 28 °C acarretou em uma variação na produção máxima de tacrolimo, saindo de 9,12 mg L<sup>-1</sup> para 116,30 mg L<sup>-1</sup> (fermentação preliminar) e para 75 mg L<sup>-1</sup> (fermentação posterior). Com estes resultados, decidiu-se realizar variações e adições ao meio de cultivo. Foram adicionados 0,0025% de ácido picolínico e 0,1 % de L-lisina. A suplementação do meio com ácido picolínico levou à redução na produção, sendo 71,93 mg L<sup>-1</sup> a produção máxima de tacrolimo. A L-lisina não apresentou desempenho satisfatório, como o descrito na Literatura. A glicose, como fonte primária de carbono, apresentou produção máxima de 35,91 mg L<sup>-1</sup>, o que representa uma redução de 3,23 vezes, quando comparamos com a maltose para a mesma razão carbono/nitrogênio, 0,5:1,0. Notou-se que, para a glicose, a razão 0,75 e 1,0:1,0 apresentaram produções nominais maiores 58,74 e 51,55 mg L<sup>-1</sup>, com a razão 0,75:1,0, apresentando a melhor produção específica, 9,06 mg de tacrolimo por grama de biomassa. Dentre as variações da razão de maltose estudadas, a razão 0,75:1,0, apresentou os melhores resultados: 74, 15 mg L<sup>-1</sup> de produção nominal e 10,47 mg g<sup>-1</sup> como produção específica. As produções específicas para a maltose e glicose apresentaram a mesma ordem de grandeza, porém, com meios suplementados, o meio com maltose obteve os melhores resultados.

**Palavras-chave:** tacrolimo, imunossupressão, fermentação, *Streptomyces*.

## ABSTRACT

Tacrolimus is a potent immunosuppressant produced by fermentation by bacteria of the genus *Streptomyces*, with *Streptomyces tsukubaensis* being the first of its kind to produce tacrolimus. Maltose and glucose were evaluated as primary carbon sources in this work, as well as soy peptone and steep corn liquor as nitrogen sources. The sources of carbon and nitrogen were evaluated for their ratio present in the fermentation medium. Also, in order to evaluate the fermentation process, some process changes were performed, such as shaker speed and fermentation temperature. The fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks at the Laboratory of Biochemical Engineering, Biorefining and Products of Renewable Origin, the analytical analyzes were carried out in the Mass Transfer Processes Laboratory of the Department of Process Engineering School of Chemical Engineering at the State University of Campinas. The results elucidated that the reduction of the initial temperature from 30 to 28 ° C resulted in a variation in the maximum production of tacrolimus, from 9.12 mg L<sup>-1</sup> to 116.30 mg L<sup>-1</sup> (preliminary fermentation) and to 75 mg L<sup>-1</sup> (subsequent fermentation). With these results, it was decided to carry out variations and additions to the culture medium. 0.0025% picolinic acid and 0.1% L-lysine were added. Supplementation of the medium with picolinic acid led to a reduction in production, with 71.93 mg L<sup>-1</sup> being the maximum production of tacrolimus. L-lysine did not perform satisfactorily, as described in the literature. The glucose as a primary source of carbon had a maximum production of 35.91 mg L<sup>-1</sup>, which represents a reduction of 3.23 folds when compared to maltose for the same carbon / nitrogen ratio, 0.5:1.0. It was observed that, for glucose, the ratio 0.75 and 1.0: 1.0 presented higher nominal yields 58.74 and 51.55 mg L<sup>-1</sup>, with the ratio 0.75: 1.0, showing the best specific yield, 9.06 mg of tacrolimus per gram of biomass. Among the variations of the maltose ratio studied, the 0.75: 1.0 ratio showed the best results: 74, 15 mg L<sup>-1</sup> of nominal production and 10.47 mg g<sup>-1</sup> as specific production. The specific productions for maltose and glucose presented the same order of magnitude, but with supplemented media, the medium with maltose obtained the best results.

**Key words:** tacrolimus, immunosuppression, fermentation, *Streptomyces*.

## LISTA DE FIGURAS

|            |                                                                                                                         |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.1 | Estrutura molecular do tacrolimo monohidratado.                                                                         | 22 |
| Figura 2.2 | Análogos tipicamente produzidos na biossíntese do tacrolimo (adaptada de JUNG <i>et al.</i> 2011).                      | 33 |
| Figura 2.3 | Ciclo de crescimento microbiano padrão em fermentação do tipo batelada (adaptada de KOLTER, SIEGELE, TORMO, 1993).      | 36 |
| Figura 2.4 | Determinação gráfica do tempo médio de geração durante cultivo em batelada (adaptada de EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012). | 37 |
| Figura 2.5 | Tacrolimo, tautômero I e tautômero II, processo de epimerização (adaptada de AKASHI <i>et al.</i> 1996).                | 43 |
| Figura 3.1 | Representação esquemática da pré-inoculação, inoculação e fermentação.                                                  | 52 |
| Figura 4.1 | Curva de DSC do padrão do tacrolimo.                                                                                    | 56 |
| Figura 4.2 | Espectro de FT-IR do tacrolimo.                                                                                         | 57 |
| Figura 4.3 | Curva termogravimétrica do padrão de tacrolimo.                                                                         | 58 |
| Figura 4.4 | Espectro de FT-IR do tacrolimo.                                                                                         | 59 |
| Figura 4.5 | Efeito da temperatura e água no equilíbrio tautomérico.                                                                 | 60 |
| Figura 4.6 | Cromatograma do padrão de tacrolimo em coluna analítica C18.                                                            | 62 |
| Figura 4.7 | Curva de calibração do tacrolimo.                                                                                       | 63 |
| Figura 4.8 | Amostra de fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> para a produção de tacrolimo.                                         | 64 |

|             |                                                                                                                                |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.9  | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL a 30 °C por 10 dias.                                                       | 66 |
| Figura 4.10 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL e 0,1 % de L-lisina a 30 °C por 10 dias.                                   | 67 |
| Figura 4.11 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL e 0,0025 % de ácido picolínico a 30 °C por 10 dias.                        | 68 |
| Figura 4.12 | Produção específica do tacrolimo via fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> em meio MPL a 30 °C.                               | 69 |
| Figura 4.13 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL a 28 °C por 10 dias.                                                       | 70 |
| Figura 4.14 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL e 0,1 % de L-lisina a 28 °C por 10 dias.                                   | 71 |
| Figura 4.15 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL e 0,0025 % de ácido picolínico a 28 °C por 10 dias.                        | 72 |
| Figura 4.16 | Produção específica do tacrolimo via fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> em meio MPL a 28 °C (a) e produção de biomassa (b) | 73 |
| Figura 4.17 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL e razão C:N nominal de 2:1                                                 | 75 |
| Figura 4.18 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL e razão C:N nominal de 3:1                                                 | 76 |
| Figura 4.19 | Fermentação por <i>S. tsukubaensis</i> com meio MPL e razão C:N nominal de 3:1 sem a adição de licor íngreme de milho          | 77 |
| Figura 4.20 | Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,25:1,0.                                                                    | 79 |
| Figura 4.21 | Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,50:1,0                                                                     | 80 |

|             |                                                                                              |     |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 4.22 | Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,75:1,0.                                  | 81  |
| Figura 4.23 | Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 1,0:1,0.                                   | 82  |
| Figura 4.24 | Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,5:1,0 suplementado com L-lisina.         | 84  |
| Figura 4.25 | Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,5:1,0 suplementado com ácido picolínico. | 85  |
| Figura 4.26 | Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 0,25:1,0.                                  | 87  |
| Figura 4.27 | Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 0,50:1,0                                   | 88  |
| Figura 4.28 | Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 0,75:1,0                                   | 89  |
| Figura 4.29 | Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 1,0:1,0                                    | 90  |
| Figura A.1  | Curva de calibração para a glicose                                                           | 115 |
| Figura A.2  | Curva de calibração para a maltose                                                           | 116 |
| Figura A.3  | Ensaio de carbono orgânico total e nitrogênio Kjeldahl em licor íngreme de milho.            | 117 |
| Figura A.4  | Ensaio de carbono orgânico total e nitrogênio Kjeldahl em peptona de soja.                   | 118 |

## LISTA DE TABELAS

|            |                                                                                                                                                             |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 2.1 | Estiramentos de grupos funcionais do espectro de infravermelho do tacrolimo (adaptada de KINO <i>et al.</i> , 1987a; NAMIKI <i>et al.</i> , 1993).          | 23 |
| Tabela 2.2 | Dados brasileiros de transplantes de órgãos.                                                                                                                | 25 |
| Tabela 2.3 | Necessidade estimada para transplantes em 2016.                                                                                                             | 26 |
| Tabela 2.4 | Transplantes realizados no HC entre 2012-2017                                                                                                               | 26 |
| Tabela 2.5 | Atividade biológica de metabólitos secundários de importância industrial de <i>Streptomyces</i> (adaptada de BARRIOS-GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ E TOMASINI, 2003). | 30 |
| Tabela 2.6 | Resumo de cepas produtoras de tacrolimo descritas na literatura (adaptada de BARREIO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014).                                              | 34 |
| Tabela 2.7 | Fontes de carbono, nitrogênio e fosfato para a produção do tacrolimo.                                                                                       | 42 |
| Tabela 2.8 | Resumo dos métodos analíticos empregados pelos autores para a quantificação de tacrolimo produzido por fermentação.                                         | 45 |
| Tabela 3.1 | Meio <i>Streptomyces</i> GYM.                                                                                                                               | 46 |
| Tabela 3.2 | Relação de compostos utilizados para a pré-inoculação, inoculação e fermentação.                                                                            | 47 |
| Tabela 3.3 | Lista de materiais para a determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson.                                                                 | 48 |
| Tabela 3.4 | Meio de pré-inoculação e inoculação.                                                                                                                        | 49 |
| Tabela 3.5 | Composição e parâmetros utilizados para a produção do tacrolimo.                                                                                            | 50 |

|            |                                                                                                 |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 4.1 | Resultados de análise de COT e nitrogênio Kjeldahl em peptona de soja e licor íngreme de milho. | 65 |
| Tabela 4.2 | Razões carbono/nitrogênio nominais e reais para fermentação conduzida por 10 dias.              | 75 |
| Tabela 4.3 | Razões carbono/nitrogênio nominais e reais.                                                     | 78 |
| Tabela 4.4 | Produção específica do tacrolimo em relação às razões carbono/nitrogênio avaliadas.             | 83 |
| Tabela 4.5 | Dados de velocidade de crescimento específico para biomassa e tacrolimo                         | 91 |
| Tabela 4.6 | Custos para a produção de 1 grama de tacrolimo.                                                 | 92 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|                           |                                                                                                                         |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACP                       | Do inglês <i>acyl carrier protein</i> – proteína carreadora de acil.                                                    |
| Adeka Nol OG <sup>®</sup> | 1,2-Octanediol. C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> .                                                         |
| C18                       | Octadecilsilano.                                                                                                        |
| CBMAI                     | Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria.                                                           |
| CoA                       | Coenzima A.                                                                                                             |
| CONITEC                   | Comitê Nacional de Incorporação de Tecnologias.                                                                         |
| COT                       | Carbono Orgânico Total.                                                                                                 |
| CPQBA                     | Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.                                                  |
| CQA                       | Centro de Qualidade Analítica.                                                                                          |
| CsA                       | Ciclosporina A.kl                                                                                                       |
| DA                        | Dermatite atópica.                                                                                                      |
| DO                        | Densidade ótica.                                                                                                        |
| DO <sub>600</sub>         | Densidade ótica avaliada a 600nm.                                                                                       |
| DSC                       | Do inglês <i>Differential scanning calorimetry</i> – calorimetria exploratória diferencial.                             |
| DSMZ                      | Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares.                                                                   |
| DTG                       | Do inglês <i>Derivative thermogravimetric analysis</i> – termogravimetria derivada.                                     |
| FDA                       | Do inglês <i>Food and Drug Administration</i> .                                                                         |
| FK506                     | Tacrolimo.                                                                                                              |
| FT-IR                     | Do inglês <i>Fourier Transform infrared spectroscopy</i> – Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier. |

|                                 |                                                                                                             |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GYM                             | Do inglês <i>Glucose, yeast extract, malt extract</i> – glicose, extrato de levedura, extrato de malte.     |
| HPLC                            | Do inglês <i>High performance liquid chromatography</i> – cromatografia líquida de alta eficiência.         |
| IL-8                            | Interleucina 8.                                                                                             |
| InCor-HC/FMUSP                  | Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.        |
| MOPS                            | Ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico. $C_7H_{15}NO_4S$ .                                                |
| MPL1,2,3                        | Maltose, peptona de soja, licor íngreme de milho. A numeração denota diferentes razões carbono:nitrogênio.  |
| N - Kjeldahl                    | Teor de Nitrogênio Total.                                                                                   |
| <i>Pharmamedia</i> <sup>®</sup> | Composto a base proteínas globulares não hidrolisadas oriundas de processos de extração especiais de óleos. |
| PKS                             | Do inglês <i>Polyketide synthases</i> – policetídeo sintase.                                                |
| SUS                             | Sistema Único de Saúde.                                                                                     |
| TGA                             | Do inglês <i>Thermogravimetry analysis</i> – análise termogravimétrica.                                     |
| ua                              | Unidade de área.                                                                                            |

# SUMÁRIO

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>AGRADECIMENTOS .....</b>                                           | <b>5</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>                                                    | <b>7</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                  | <b>8</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                          | <b>9</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>                                         | <b>12</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>                                     | <b>14</b> |
| <b>SUMÁRIO .....</b>                                                  | <b>16</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                            | <b>19</b> |
| 1.1 Apresentação do problema.....                                     | 19        |
| 1.2 Objetivo geral .....                                              | 21        |
| 1.2.1 Objetivos específicos .....                                     | 21        |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                 | <b>22</b> |
| 2.1 Tacrolimo, propriedades físico-químicas e mecanismo de ação ..... | 22        |
| 2.1.1 Tacrolimo em uso tópico .....                                   | 24        |
| 2.2 Breve panorama de transplantes de órgãos no Brasil .....          | 25        |
| 2.3 <i>Streptomyces</i> e breve biossíntese do tacrolimo.....         | 28        |
| 2.4 Fermentação.....                                                  | 31        |
| 2.4.1 Fermentação para a produção do tacrolimo.....                   | 32        |
| 2.4.2 Ciclo de crescimento bacteriológico.....                        | 35        |
| 2.4.3 Regulação pela fonte de carbono.....                            | 39        |
| 2.4.4 Regulação pela fonte de nitrogênio .....                        | 40        |
| 2.4.5 Regulação pela fonte de fosfato.....                            | 41        |

|           |                                                                                       |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5       | Métodos analíticos para a quantificação do tacrolimo.....                             | 42        |
| <b>3.</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                      | <b>46</b> |
| 3.1       | Materiais .....                                                                       | 46        |
| 3.1.1     | Material biológico.....                                                               | 46        |
| 3.1.2     | Meios para cultivo em placa e meios de pré-inoculação e<br>inoculação.....            | 46        |
| 3.1.3     | Equipamentos, solventes, coluna analítica e padrão do tacrolimo ..                    | 47        |
| 3.1.4     | Materiais para a determinação de açúcares .....                                       | 48        |
| 3.2       | Métodos .....                                                                         | 49        |
| 3.2.1     | Placas de Petri.....                                                                  | 49        |
| 3.2.2     | Pré-inoculação e inoculação .....                                                     | 49        |
| 3.2.3     | Fermentação em frascos .....                                                          | 50        |
| 3.2.4     | Curva analítica .....                                                                 | 52        |
| 3.2.5     | Preparo das amostras e método analítico.....                                          | 53        |
| 3.2.6     | Determinação de maltose.....                                                          | 53        |
| 3.2.7     | Determinação de glicose.....                                                          | 55        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>                                                  | <b>56</b> |
| 4.1       | Caracterização do padrão de tacrolimo.....                                            | 56        |
| 4.1.1     | Análises térmicas e calorimétricas.....                                               | 56        |
| 4.1.2     | Espectro de FT-IR.....                                                                | 59        |
| 4.2       | Avaliação da fase móvel e identificação dos tautômeros do padrão de<br>tacrolimo..... | 60        |
| 4.3       | Método analítico para a quantificação do tacrolimo.....                               | 61        |
| 4.4       | Avaliação das fontes primárias de carbono e de nitrogênio .....                       | 65        |
| 4.5       | Fermentações preliminares .....                                                       | 66        |
| 4.5.1     | Fermentação com maltose a 30 °C e duração de 10 dias.....                             | 66        |
| 4.5.2     | Fermentação com maltose a 28 °C e duração de 10 dias.....                             | 70        |

|           |                                                                                                  |            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.6       | Fermentação com maltose e variação na razão C:N conduzida por 7 dias.....                        | 74         |
| 4.7       | Fermentações com meio GPL e variações na razão carbono/nitrogênio.....                           | 78         |
| 4.8       | Fermentações com meio GPL suplementado com L-lisina e ácido picolínico.....                      | 84         |
| 4.9       | Fermentações com meio MPL e variações na razão carbono/nitrogênio.....                           | 86         |
| 4.10      | Análise de razão de crescimento específico para a fase exponencial da fermentação.....           | 91         |
| 4.11      | – Análise de custos das matérias primas para a produção de tacrolimo com os meios estudados..... | 92         |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>                                             | <b>94</b>  |
| <b>6.</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                          | <b>97</b>  |
|           | <b>APÊNDICE A.....</b>                                                                           | <b>115</b> |
|           | Curva de calibração da glicose e maltose .....                                                   | 115        |
|           | <b>ANEXO A .....</b>                                                                             | <b>117</b> |
|           | Laudos de ensaios CQA.....                                                                       | 117        |
|           | <b>ANEXO B .....</b>                                                                             | <b>119</b> |
|           | Artigos publicados em Anais de Congressos.....                                                   | 119        |

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

A utilização da imunossupressão clínica começou no início da década de 1950, com o uso de glucocorticóides combinados à azatioprina e/ou globulinas antilinfocíticas e permaneceram como o principal tratamento imunossupressor até o começo da década de 1980, quando a ciclosporina (CsA) foi lançada no mercado norte americano, e representou ganho substancial para a sobrevivência de pacientes com transplantes de rim. Entretanto, mesmo utilizada com rigoroso controle, a ciclosporina pode causar nefrotoxicidade crônica, hipertensão, dislipidemia, hiperplasia gengival e tremores (ABBUD FILHO E RAMALHO, 1997; GUERRA JÚNIOR, 2010).

Em 1984, cientistas da Fujisawa Pharmaceutical Co. separaram o tacrolimo (FK506) a partir de amostra de caldo fermentado pela bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, isolada de uma amostra de solo da região do monte Tsukuba, no Japão. Em 1987 o grupo havia elucidado a estrutura química do tacrolimo, além de seu potente efeito imunossupressor, as condições de fermentação, técnicas de purificação do fármaco, características físico-químicas e biológicas (KINO *et al.*, 1987a; KINO *et al.*, 1987b; TANAKA *et al.*, 1987). Após anos de estudos clínicos, em 1994, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso do tacrolimo como imunossupressor em transplantes renais. Desde então, o fármaco vem sendo muito utilizado no tratamento terapêutico contra rejeição de órgãos, tomando o lugar da ciclosporina (TURLO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017; MEIER-KRIESCHE *et al.*, 2006). Além da função imunossupressora, o tacrolimo ainda possui aplicações tópicas em doenças como vitiligo (GRIMES *et al.* 2004), doenças autoimunes como líquen plano (SÁNCHEZ *et al.* 2004), e doenças oculares como uveítes (HOGAN *et al.*, 2007; SOUZA, 2012).

Os produtos derivados do tacrolimo produzidos pela Astellas Pharma Inc. são o Prograf<sup>®</sup>, Advagraf<sup>®</sup>, Graceptor<sup>®</sup>, ASTRAGRAF XL<sup>®</sup>, Prograf XL<sup>®</sup> e Protopic<sup>®</sup>.

Foram comercializados, em 2016, US\$ 1,841 bilhão destes medicamentos em todo o mundo, este valor representa 15,4 % do mercado de imunossupressores mundial (Relatório Anual Astellas Pharma Inc. 2016, disponível em: [https://www.astellas.com/en/ir/library/pdf/2016AR\\_en.pdf](https://www.astellas.com/en/ir/library/pdf/2016AR_en.pdf)).

O Brasil possui o maior sistema público de transplantes de órgãos do mundo, no qual cerca de 95 % dos transplantes são feitos com recursos públicos. O Sistema Único de Saúde (SUS) provê assistência integral ao transplantado e, em 2002 foram estabelecidos protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas para o uso de medicamentos excepcionais e de alto custo pelo SUS. Inicialmente, em junho de 2002, o tacrolimo foi aprovado para comercialização no Brasil com indicação específica de resgate de rejeição em pacientes que sofreram transplantes alogênicos de rins e fígado (GUERRA JÚNIOR, 2010).

Entre 2010 e 2014, o InCor-HC/FMUSP estudou o uso do tacrolimo em transplantes cardíacos, a pedido do Comitê Nacional de Incorporação de Tecnologias SUS (CONITEC), e em 2015, o fármaco passou a incorporar os protocolos de imunossupressão de transplantes cardíacos. O estudo ainda evidenciou que a probabilidade de sobrevida do transplantado tem uma acentuada melhora com o uso de protocolos imunossupressores que utilizam tacrolimo combinado as demais drogas previamente prescritas. Os efeitos no sistema nervoso central e um risco maior de rejeição celular aguda, em decorrência de resposta imunológica, causados pelo uso da ciclosporina na população pediátrica, recomenda-se a utilização do tacrolimo como primeira opção entre os inibidores da calcineurina. (Relatório de Recomendação, nº 175, disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Imunossupressores\\_TransplanteCardiaco\\_final.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2015/Imunossupressores_TransplanteCardiaco_final.pdf)).

A relevância clínica e econômica do tacrolimo fez com que diversas companhias desenvolvessem programas para isolar suas próprias cepas produtoras do fármaco, além de diversos estudos em diferentes fontes de carbono e nitrogênio (YOON e CHOI, 1997; SINGH e BEHERA, 2009; MISHRA e VERMA, 2012), em modificação genética de cepas (MO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015). Adicionalmente, a rota biossintética do tacrolimo foi proposta por Motamedi *et al.*, (1996) e Motamedi e Shafiee (1998) o que deu suporte para estudos de precursores do fármaco como o ácido picolínico e ácido nicotínico (MISHRA e VERMA, 2012; TURLO *et al.*, 2012, HUANG *et al.*, 2013; SUN e YE, 2016).

## 1.2 OBJETIVO GERAL

A partir da fermentação da glicose, maltose, peptona de soja e licor íngreme de milho pela bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, avaliar a produção do tacrolimo em meio líquido.

### 1.2.1 Objetivos específicos

Com o intuito de melhor avaliar a produção e a caracterização do fármaco produzido, devem-se traçar as seguintes etapas, explicadas de forma mais detalhada nos capítulos seguintes:

- avaliar, qualitativamente, por meio de técnicas distintas o padrão de tacrolimo tais como: análise de calorimetria diferencial de varredura, análise termogravimétrica, método cromatográfico e espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR);
- avaliar a maltose como fonte de carbono viável para a produção do tacrolimo em fermentação agitada em frascos;
- avaliar a glicose como fonte de carbono alternativa à maltose;
- variar a razão carbono/nitrogênio no meio líquido e analisar a resposta para assim definir o meio mais adequado para a produção;
- monitorar o consumo de maltose e glicose durante a fermentação.

# Capítulo 2

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

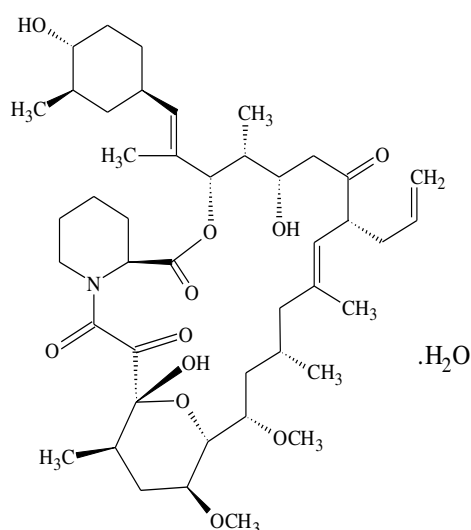
---

### 2.1 TACROLIMO, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO

O tacrolimo, também conhecido como FK506 ou Fujimicina, é uma lactona macrolídea, altamente hidrofílica e pouco solúvel em água ( $4\text{--}12\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ), porém, altamente solúvel em solventes orgânicos. A massa molar de  $822,05\ \text{g mol}^{-1}$ , cuja fórmula empírica é  $\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{NO}_{12}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , a estrutura molecular monodidrata do fármaco está representada na Figura 2.1.

O FK506 foi inicialmente isolado a partir do caldo fermentado de uma cepa de bactérias coletada no monte Tsukuba, Japão, por pesquisadores da Fujisawa Pharmaceutical Co., em 1984. A denominação “*tacrolimus*” é a combinação das letras “*t*”, de Tsukuba, “*acrol*”, de macrolídeo, e “*imus*”, devido ser um imunossupressor (TAMURA *et al.*, 2001; AMAYA *et al.*, 2002).

Figura 2.1 – Estrutura molecular do tacrolimo monohidratado



O ponto de fusão do tacrolimo se encontra na faixa de 127-130 °C e, em estado sólido, é estável em temperaturas de 24 a 30 °C por um período de até 6 meses. Como evidenciado na Figura 2.1, o fármaco possui em sua estrutura química grupos funcionais hidroxila, carbonila e amida, que podem ser identificados através de espectro de FT-IR. Na Tabela 2.1 apresentam-se os estiramentos e comprimentos de onda para os grupos funcionais (VENKATARAMANAN *et al.*, 1987; KINO *et al.*, 1987a).

Tabela 2.1 – Estiramentos de grupos funcionais do espectro de infravermelho do tacrolimo

| Estiramento           | Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|-----------------------------------------|
| OH                    | 3.450                                   |
| C=O de éster e cetona | 1.741, 1.725 e 1.690                    |
| C=C e N-H             | 1.639                                   |
| C-O de éster          | 1.194                                   |
| C-O-C de éter         | 1.172 e 1.093                           |
| C-H de alcanos        | 2.810                                   |

Fonte: KINO *et al.*, 1987a; NAMIKI *et al.*, 1993; YAMASHITA *et al.*, 2003.

Kino *et al.* (1987a) foram os primeiros a publicar sobre o efeito imunossupressor do tacrolimo, os autores relataram que, se comparado a ciclosporina A (CsA), o fármaco mostrou-se de 50 a 100 vezes mais potente em diferentes ensaios de células *in vitro*. Embora estruturalmente não relacionados, o tacrolimo e a CsA possuem efeitos celulares similares e característicos, ambos exercem sua atividade via uma proteína de ligação intracelular, conhecida como imunofilina. O mecanismo de ação do tacrolimo foi inicialmente tido com a inibição da ativação das células T nos primeiros ciclos do estágio celular, G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>. O mecanismo de ação do tacrolimo e CsA são similares, entretanto o tacrolimo se liga à imunofilina *FK-binding protein isoenzyme 120* (FKBP-12), ao passo que a CsA se liga a ciclofilina (AMAYA *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2004).

Devido sua eficácia imunossupressora, o tacrolimo possui diversas aplicações na medicina. Inicialmente ele foi empregado no tratamento de pacientes com casos de rejeição refratária e/ou com intolerância à ciclosporina e, posteriormente, como droga imunossupressora primária e imunossupressão de resgate em transplante de órgãos

sólidos como fígado e rim (STARZL *et al.*, 1989; AMAYA *et al.*, 2002). Adicionalmente, o tacrolimo foi utilizado com sucesso no transplante de outros órgãos sólidos, incluindo coração (MEISER *et al.*, 1998), pâncreas (BARTLETT *et al.*, 1996), pulmão (REICHENSPURNER *et al.*, 1999) e intestino (GRANT, 1996).

### 2.1.1 Tacrolimo em uso tópico

O tacrolimo administrado como pomada surgiu no Japão em 1999, nos Estados Unidos em 2000, e no Brasil em 2005, e é comercializado no mercado sob o nome comercial de Protopic<sup>®</sup>, contendo 0,1% do fármaco para uso adulto e 0,03% para uso pediátrico (GONTIJO *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação do tacrolimo em inibir a função da calcineurina permitiu estudos de produtos em aplicações tópicas, pois ele controla o processo inflamatório de maneira eficaz com baixo desenvolvimento de efeitos colaterais sistêmicos (CASTRO, 2006). Adicionalmente, a supressão da ativação de células T sugere que o tacrolimo interfere com a imunopatogênese da psoríase pela diminuição de mediadores pró-inflamatórios, IL-8, em seus queratinócitos (RUZICKA *et al.*, 1999). De acordo com o mencionado, estudos com o tacrolimo administrado de forma tópica mostraram que o fármaco penetra na pele em quantidades excedentes à ciclosporina tópica, por exemplo (LAUERMA *et al.*, 1992).

Dentre as aplicações tópicas do tacrolimo, pode-se citar a dermatite atópica (DA), que é uma dermatose inflamatória crônica de etiologia multifatorial, caracterizada por prurido intenso e xerose cutânea, que afeta cerca de 10% das crianças e 4,7% dos adolescentes. Pomadas contendo 0,03% e 0,1%, de tacrolimo apresentaram resultados satisfatórios no tratamento da DA (HANIFIN e RAJKA, 1980; RUZICKA *et al.*, 1999; GONTIJO *et al.*, 2008).

Além da DA, os inibidores da calcineurina podem ser utilizados no tratamento de uma dermatose grave de difícil tratamento e de significativo impacto psicossocial, o vitiligo, dermatose essa que acomete até 2% da população. O tratamento com pomada contendo 0,1% de tacrolimo mostrou-se altamente eficaz na repigmentação da pele, bem como no retardamento do avanço da doença (TAMLER *et al.*, 2009; ROKNI *et al.*, 2017).

## 2.2 BREVE PANORAMA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS NO BRASIL

O Brasil possui um lugar de destaque no programa de transplantes de órgãos no mundo. De acordo com os dados da Associação Brasileira Transplante de Órgãos, em 2015, o Brasil ficou em segundo lugar no número absoluto de transplantes renais e hepáticos, atrás apenas dos Estados Unidos da América. Quando estes dados sobre transplantes são apresentados com uma fração do PIB, o Brasil é aquele que apresenta o melhor desempenho no mundo (GARCIA e PACHECO, 2016).

A doação de órgãos no Brasil é regulamentada pelo Sistema Nacional de Transplantes (SNT), criado pelo Decreto N° 2.268 de 30 de junho de 1997. O SNT é responsável pelo controle e monitoramento do processo de doação de órgãos e tecidos e transplantes, bem como ações de gestão política, promoção da doação, logística, credenciamento das equipes e hospitais para a realização de transplantes, definição do financiamento e acompanhamento dos pacientes transplantados.

O número de doadores efetivos por milhão de pessoas (pmp) apresenta tendência crescente. Em 2009, o Brasil apresentava 9,0 doadores efetivos (pmp), ao passo que em 2017 (entre janeiro e setembro), foram registrados 16,6 doadores efetivos (pmp). Os estados de Santa Catarina e Paraná apresentaram as maiores taxas de doadores (pmp), 38 e 37,7. Como comparativo, a lista de espera de transplantes renais no Brasil, em dezembro de 2016, era de 21.264 pacientes, o que representaria 104 (pmp). A Tabela 2.2 apresenta os dados do Registro Brasileiro de Transplantes e sua tendência crescente, entre 2010 e 2016 (GARCIA e PACHECO, 2017).

Tabela 2.2 – Dados brasileiros de transplantes de órgãos

| Número<br>absoluto de<br>transplantes | 2010   | 2011   | 2012   | 2013   | 2014   | 2015   | 2016   |
|---------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Córnea                                | 12.778 | 14.726 | 15.280 | 13.744 | 13.036 | 13.861 | 14.534 |
| Rim                                   | 4.662  | 4.993  | 5.435  | 5.464  | 5.657  | 5.588  | 5.492  |
| Fígado                                | 1.413  | 1.496  | 1.601  | 1.722  | 1.757  | 1.809  | 1.880  |
| Pâncreas                              | 133    | 181    | 153    | 143    | 128    | 120    | 134    |
| Coração                               | 166    | 160    | 228    | 271    | 311    | 353    | 357    |
| Pulmão                                | 61     | 49     | 69     | 80     | 67     | 74     | 92     |

Fonte: GARCIA e PACHECO, 2017.

Apesar da crescente tendência nos transplantes de órgãos no Brasil, os valores apresentados para 2016 ficaram abaixo da necessidade estimada para o mesmo ano. De acordo com o Registro Brasileiro de Transplantes, os números da necessidade estimada para 2016 são como apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Necessidade estimada para transplantes em 2016

| Órgão   | Número de transplantes |
|---------|------------------------|
| Córnea  | 18.401                 |
| Rim     | 12.267                 |
| Fígado  | 5.111                  |
| Coração | 1.636                  |
| Pulmão  | 1.636                  |

Fonte: GARCIA e PACHECO, 2016.

Outro indicador dessa tendência crescente nos transplantes de órgãos no Brasil foi o número de transplantes realizados em 2017 no Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC), 485 transplantes de diferentes órgãos. Este aumento está diretamente ligado ao aumento de notificações de possíveis doadores e captação (disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/noticias/2018/01/11/hospital-de-clinicas-da-unicamp-bate-recorde-de-transplantes>). A Tabela 2.4 apresenta os dados absolutos de transplantes entre 2012 e 2017.

Tabela 2.4 – Transplantes realizados no HC entre 2012-2017

| Número absoluto de transplantes | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| TMO                             | 68   | 43   | 37   | 42   | 37   | 43   |
| Rim                             | 91   | 115  | 120  | 127  | 136  | 148  |
| Fígado                          | 39   | 50   | 44   | 51   | 47   | 70   |
| Córnea                          | 89   | 70   | 75   | 97   | 123  | 218  |
| Cardíaco                        | 14   | 12   | 5    | 6    | 8    | 6    |

Os dados de doadores por milhão de pessoas e das Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4 apontam aspectos positivos no sistema de transplantes no Brasil como, um sistema consolidado e melhora progressiva no número de doadores (pmp). Entretanto, mesmo o recente crescimento é insuficiente para suprir toda a demanda de transplantes. Outro ponto importante é a recusa familiar para os transplantes, em 2009 a recusa ficava na faixa de 1.390 doadores potenciais, ao passo que em 2016 este número subiu para 2.571 (GARCIA e PACHECO, 2016).

O Portal da Saúde do Governo Federal (disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/sas/transplantes>) disponibiliza os dados de gastos anuais com procedimentos hospitalares, produção ambulatorial, imunossuppressores e gastos com líquido de preservação. Em 2008 os gastos totais com transplantes situavam-se ao redor de 720 milhões de reais. De 2008 até 2015 estes gastos tiveram elevação de 74,8%, passando para mais de 1 bilhão e 258 milhões de reais. Do total dos 720 milhões de recursos do Sistema Único de Saúde (SUS) utilizados em 2008 para os transplantes no Brasil, 265 milhões foram destinados à imunossupressão terapêutica. Em 2015 o custo com imunossupressão passou para 362 milhões de reais.

A Lei nº 12.401, publicada em 28 de abril de 2011, dispõe sobre a assistência terapêutica e a incorporação de tecnologias em saúde no âmbito do SUS. A referida Lei define, ainda, que o Ministério da Saúde, assessorado pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), tem como atribuição a incorporação, exclusão ou alteração de novos medicamentos, produtos e procedimentos, além da constituição ou alteração de protocolo clínico ou de diretriz terapêutica (Relatório de Recomendação do Ministério da Saúde, 2015. Disponível em [http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2015/Relatorio\\_Imunossuppressores\\_TransplantePulmonar\\_CP.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2015/Relatorio_Imunossuppressores_TransplantePulmonar_CP.pdf)).

Em se tratando de transplantes renais, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para imunossupressão no transplante renal, admite o uso do tacrolimo como medicamento participante da diretriz tríplice para a terapêutica da imunossupressão. O protocolo de imunossupressão para cada paciente será dado pelo profissional da saúde, considerando: diagnóstico de rejeição, a proveniência do órgão (de doador vivo ou doador falecido), histórico do paciente, paciente com alguma outra doença grave. Para o início da imunossupressão o protocolo sugere o uso do tacrolimo, azatioprina, prednisona e timoglobulina (ATG), salvo para pacientes

hipersensibilizados, para os quais sugere-se o anti corpo monoclonal anti-CD3 (PICON, GADELHA e ALEXANDRE, 2014).

A imunossupressão de manutenção é dada conforme o esquema de imunossupressão tríplice com prednisona, azatioprina e ciclosporina ou tacrolimo. Apesar do mecanismo de ação do tacrolimo ser equiparado à ciclosporina, ele tem sido utilizado em razão da evidência de melhores resultados e menores taxas de rejeição aguda quando comparado com esquema imunossupressor composto por ciclosporina (CHOCAIR *et al.* 1993; PICON, GADELHA e ALEXANDRE, 2014). Em tratamentos de rejeição aguda, o tacrolimo é recomendado ser utilizado em associação à metilprednisolona. O esquema imunossupressor para idosos, crianças e adolescentes em casos de rejeição aguda e em casos de rejeição refrataria, recomenda-se a substituição da ciclosporina pelo tacrolimo (PICON, GADELHA e ALEXANDRE, 2014).

Os esquemas propostos pelo SUS apontam que 93 % de pacientes receptores de doadores vivos possuem uma sobrevida além do sétimo ano, ao passo que 84 % dos receptores de doadores falecidos alcançam o sétimo ano. A sobrevida do enxerto, ou seja, do órgão é de 84 % para doadores vivos e 70 % para doadores falecidos (GARCIA e PACHECO, 2016). O Ministério da Saúde admite o uso do tacrolimo em esquemas imunossupressores para receptores em transplantes cardíacos, hepáticos e pulmonares, além do tratamento de síndrome nefrótica primária em crianças e adolescentes (GARCIA e PACHECO, 2016).

### **2.3 *Streptomyces* E BREVE BIOSSÍNTESE DO TACROLIMO**

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas que crescem em diversos ambientes, principalmente no solo ( $10^4 - 10^6$  esporos de actinomicetos por grama de solo). O solo é o habitat natural da maioria dos estreptomicetos, onde desempenham um papel fundamental na mineralização da matéria orgânica. Taxonomicamente estão classificadas no domínio Bacteria, classe Actinobacteria e ordem Actinomycetales. O principal integrante desta classe é o gênero *Streptomyces* (DYSON, 2009; MENDES, 2010; PROCÓPIO *et al.*, 2012). Muitos *Streptomyces* produzem uma substância volátil, a geosmina, que lhes confere um odor característico, o pretrichor, mais conhecido como ‘cheiro de terra molhada’ (SCHRADER e BLEVINS, 1993).

À semelhança dos fungos, o gênero *Streptomyces* possui forma filamentosa, que colonizam o meio particulado do solo com o crescimento desses filamentos e ramificações. As ramificações buscam nutrientes, metabolizando a matéria orgânica pela ação de enzimas extracelulares (DYSON, 2009). As ramificações primárias, hifas, que formam o micélio vegetativo originam hifas aéreas, formando o micélio aéreo, este passa por uma diferenciação incluindo septação e formação de esporos, nesta fase o metabolismo secundário produz antibióticos e pigmentos. Os antibióticos possuem a função de proteção dos microrganismos e competição por nutrientes (DEMAIN, 1999; CHATER, 2006).

A história de antibióticos derivados de *Streptomyces* começou com a descoberta da estreptomicina, o que intensificou a pesquisa de antibióticos entre o gênero. Entre 1945 e 1962 por volta de 80 % dos antibióticos originavam-se de actinomicetos, dentre os quais o gênero *Streptomyces* contribuiu grandemente (BÉRDY, 1974; PROCÓPIO *et al.*, 2012). A importância industrial dos metabólitos secundários do gênero *Streptomyces* é imensa, pois não se restringem a antibióticos e imunossupressores, mas incluem diversos compostos de diferentes atividades biológicas. Para a produção de antibióticos, os intracelulares intermediários comuns como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e terpenos são condensados em estruturas mais complexas, por meio de uma rota bioquímica definida. Aproximadamente 5 % do genoma dos estreptomicetos, entre 23 e 30 *clusters* de genes, é dedicado para a síntese de metabólitos secundários. Tais metabólitos não se restringem a antibióticos e imunossupressores, como pode ser evidenciado na Tabela 2.5 (BARRIOS-GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ E TOMASINI, 2003; NEWMAN e CRAGG, 2007; SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

Tabela 2.5 – Atividade biológica de metabólitos secundários de importância industrial de *Streptomyces*

| Atividade                      | Exemplo        | Microrganismo produtor                                |
|--------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------|
| Antibacteriana                 | Cefamicina     | <i>Streptomyces clavuligerus</i>                      |
|                                | Cloranfenicol  | <i>Streptomyces venezuelae</i>                        |
|                                | Canamicina     | <i>Streptomyces kanamyceticus</i>                     |
| Antifúngicos                   | Anfotericina B | <i>Streptomyces nodosus</i>                           |
|                                | Aureofacina    | <i>Streptomyces aureofaciens</i>                      |
|                                | Candididina    | <i>Streptomyces griseus</i>                           |
| Antitumorais                   | Actinomicina D | <i>Streptomyces antibioticus</i> , <i>S. parvulus</i> |
|                                | Bleomicina     | <i>Streptomyces verticillus</i>                       |
|                                | Doxorrubicina  | <i>Streptomyces peucetius</i>                         |
| Inseticidas e antiparasitários | Avermectina    | <i>Streptomyces avermitilis</i>                       |
|                                | Milbemicina    | <i>Streptomyces hygroscopicus</i>                     |

Fonte: BARRIOS-GONZÁLEZ, FERNÁNDEZ E TOMASINI, 2003.

Os metabólitos secundários produzidos pela *Streptomyces* podem ser divididos em duas grandes classes: policetídeos e peptídeos não ribossomais, estes possuem uma ampla faixa em variedades estruturais e funções fisiológicas (HWANG *et al.*, 2014). A sintase policetídeo (PKSs), complexo enzimático que produz metabólitos secundários pode ser ordenado em três grupos, dependendo de suas estruturas e funções. Os policetídeos (Grupo I PKSs) representam extenso grupo de produtos naturais com variedade em atividades biológicas, incluindo a função imunossupressora. Eles são sintetizados por meio da condensação descarboxilativa do ácido carboxílico pela PKSs (YU *et al.*, 2012).

O metabolismo secundário das bactérias é regulamentado de maneira diferente do primário, porém o metabolismo primário possui influência na regulamentação do metabolismo secundário, provendo os metabólitos precursores e reduzindo equivalentes. Os metabólitos primários servem como blocos precursores para os metabólitos secundários, incluindo acetilcoenzima A (Acetil-CoA), glicose-6-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato (G3P),  $\alpha$ -cetoglutarato e oxaloacetato, em sua maior parte no metabolismo do carbono central (MARTIN e DEMAINE, 1980; ROKEM *et al.*, 2007; VAN WEZEL e

MCDOWALL, 2011; HWANG *et al.*, 2014). Unidades extensoras como malonil-CoA e metilmalonil-CoA, em geral, estão envolvidas na formação de policetídeos. Adicionalmente, a biossíntese do tacrolimo envolve a incorporação de duas unidades extensoras incomuns derivadas da *methoxymalonyl*-ACP (envolvida também na biossíntese da ascomicina) e *allylmalonyl*-CoA (específica do tacrolimo) (BARREIRO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014).

## 2.4 FERMENTAÇÃO

A fermentação é o caminho catabólico pelo qual a energia necessária para a manutenção das células é obtida, por meio da oxidação parcial de fontes de carbono, quando a respiração não é possível (CIANI, COMITINI e MANNAZZU, 2008).

O metabolismo fermentativo é generalizado entre organismos vivos, e sua total compreensão é particularmente complicada, devido à capacidade dos organismos em fermentar uma variada abundância de substratos em diferentes condições ambientais. E, com o advento de indústrias de biotecnologia e engenharia genética, foi possível aumentar a produção de metabólitos secundários, reduzir custos e diminuir efeitos adversos para o meio ambiente (CIANI, COMITINI e MANNAZZU, 2008)

O processo de industrialização, a construção de equipamentos apropriados, desenvolvimento de métodos microbiológicos e o uso de ciências mais precisas, direcionaram processos de fermentação, transformando um grande número de processos fermentativos naturais em processos de escala industrial (CIANI, COMITINI e MANNAZZU, 2008; ALMEIDA, AMARAL e LOBÃO, 2011).

Algumas vantagens de processos fermentativos industriais são: as reações são brandas e em meio aquoso, além de a maior parte das reações ocorrer em um único vaso; os coprodutos gerados no processo são menos agressivos ao meio ambiente quando comparados a coprodutos de manufatura química. (ANDERSON, 2009). Entretanto, os processos fermentativos apresentam algumas desvantagens, como: a dificuldade e o alto custo do processo de purificação, uma vez que os produtos oriundos de fermentações estão presentes em meios complexos e em baixas concentrações, processos de biossíntese microbiológico são mais lentos que processos químicos. Por fim, raramente o efluente de uma indústria biotecnológica conterá produtos tóxicos, mas são ricos em demanda bioquímica de oxigênio (DBO), o que requer tratamento de

efluentes mais rigoroso (CIANI, COMITINI e MANNAZZU, 2008; ANDERSON, 2009).

Os produtos derivados de fermentação industrial derivam de diversas funções celulares, podendo ser divididos em dois grandes grupos: os resultantes de metabolismo primário e os resultantes de metabolismo secundário (OKAFOR, 2007). Alguns metabólitos primários, presentes no cotidiano, incluem aminoácidos (KINOSHITO, AKUDA e SHIMONŌ, 1957), vitaminas (VANDAMME, 1992; PANDEY *et al.*, 1999), ácidos orgânicos (SAUER *et al.*, 2008), solventes e combustíveis (ZVERLOV *et al.*, 2006). Alguns metabólitos secundários oriundos de *Streptomyces* já foram anteriormente citados, entretanto há classes de metabólitos secundários de grande importância no mercado provenientes de plantas, como compostos fenólicos, terpenóides, oligossacarídeos e alcaloides (WINK, 2010).

Outra grande vantagem da fermentação industrial reside em poder utilizar produtos de origem renovável, como biomassas residuais. Em se tratando de bioenergia proveniente de fontes renováveis, como o etanol, a biomassa tem um papel importante na redução de emissões de gases estufa (LIN e TANAKA, 2006; JOHN, NAMPOOTHIRI e PANDLEY, 2007)

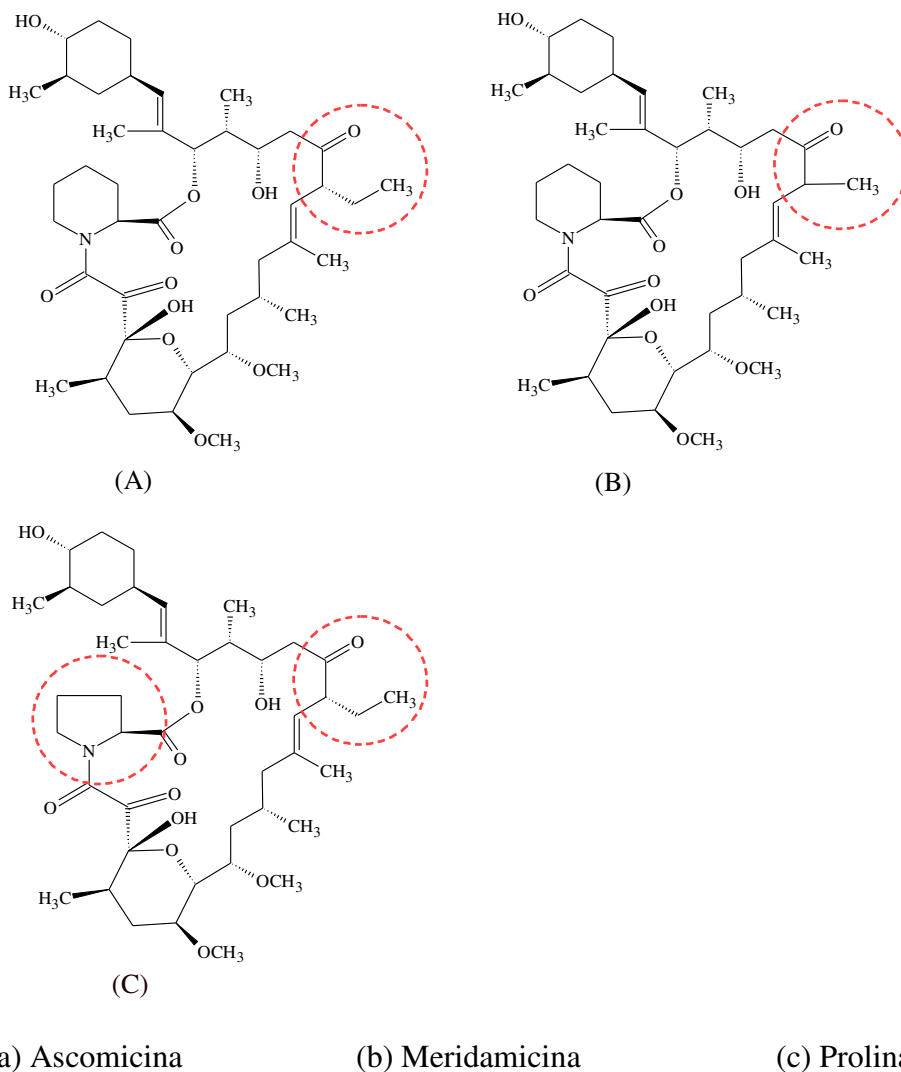
#### **2.4.1 Fermentação para a produção do tacrolimo**

O tacrolimo é um metabólito secundário e é descrito que sua produção acontece após a maior parte das células ter crescido (WANG *et al.*, 2017). As conexões entre metabolismo primário e secundário sugerem que o metabolismo primário deve ser analisado sistematicamente para a otimização do metabolismo secundário, e uma investigação na relação entre fluxos de carbono e nitrogênio com variação de fontes primárias de ambos, pode ser um estudo relevante para a produção dos metabólitos secundários (YOON e CHOI, 1997; HWNAG *et al.*, 2014).

Meios de cultura adequados promovem a produção do tacrolimo em diversas espécies de *Streptomyces*. Entre estas espécies, é reportado que a *S. tsukubaensis* é capaz de catabolizar diversas fontes de carbono como glicose, maltose glicerol, amido, dextrana e óleos vegetais, entretanto na biossíntese do tacrolimo pela *Streptomyces* há a produção de análogos ao fármaco, em geral, possuem uma estrutura similar, como a ascomicina, que pode chegar a até 20% do total de tacrolimo produzido, como exposto

na Figura 2.2 (JUNG *et al.*, 2011; MISHRA e VERMA, 2012; BARREIRO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014).

Figura 2.2 – Análogos tipicamente produzidos na biossíntese do tacrolimo



Adaptada de JUNG *et al.* 2011.

A primeira fermentação para a produção exclusiva do tacrolimo foi descrita no trabalho de Kino *et al.* (1987a), este trabalho foi a parte I de II artigos publicados sobre o recém descoberto fármaco. A parte I trata da fermentação, isolamento, características físico-químicas e biológicas do tacrolimo, ao passo que a parte II consiste em estudar os efeitos imunossupressores do FK-506 *in vitro*.

Em 1994, ano da aprovação do tacrilomo pelo FDA, o primeiro artigo sobre produção do fármaco foi publicado por um grupo não pertencente à Fujisawa Pharmaceutical Co. Shafiee, Motamedi e Chen (1994). Pesquisadores da Merck

*Research Laboratories*, os autores utilizaram uma cepa diferente da original, e com isso produziram um precursor do tacrolimo, e subsequentemente por via catalítica, o tacrolimo. O meio de produção baseou-se em trabalhos prévios na Merck, descritos em Nielsen *et al.* (1991), e divergiu muito pouco do meio original proposto por Kino *et al.* (1987a).

Yoon e Choi (1997) estudaram o efeito dos nutrientes provenientes do meio de cultivo na produção do tacrolimo. Os autores utilizaram diversas fontes primárias de carbono como, amido solúvel, glicose, maltose e arabinose, além de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio e a cepa de bactéria foi a *Streptomyces sp.* MA5868. Os autores realizaram diversas combinações de meios de cultura, porém a produção máxima atingida se situou em 30,6 mg L<sup>-1</sup>. Além das cepas de *S. tsukubaensis* e *S. sp.* MA5968, outras já foram utilizadas para a produção do tacrolimo, a Tabela 2.6 expõe as algumas cepas e os autores que as empregaram.

Tabela 2.6 – Resumo de cepas produtoras de tacrolimo descritas na literatura

| Referência                                                                                       | Nome da cepa                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Kino <i>et al.</i> (1987a); Martínez-Castro <i>et al.</i> (2013); Muramatsu <i>et al.</i> (2005) | <i>Streptomyces tsukubaensis</i> 9993, NRRL18488                      |
| Shafiee, Motamedi e Chen (1994)                                                                  | <i>Streptomyces sp.</i> MA6858                                        |
| Muramatsu <i>et al.</i> (2005); Mo <i>et al.</i> (2011)                                          | <i>Streptomyces kanamycetius</i> KCC S-0433 <sup>T</sup> (=KCTC 9225) |
| Kim e Park (2008)                                                                                | <i>Streptomyces clavuligerus</i> CKD 1119                             |
| Jung <i>et al.</i> (2009)                                                                        | <i>Streptomyces sp.</i> TST8                                          |
| Park <i>et al.</i> (2009)                                                                        | <i>Streptomyces clavuligerus</i> KCTC 10561BP                         |
| Singh e Behera (2009)                                                                            | <i>Streptomyces sp.</i> MA6858 B3178                                  |
| Mishra e Verma (2012)                                                                            | <i>Streptomyces sp.</i>                                               |
| Turlo <i>et al.</i> (2012)                                                                       | <i>Streptomyces tsukubaensis</i>                                      |
| Huang <i>et al.</i> (2013)                                                                       | <i>Streptomyces tsukubaensis</i>                                      |
| Mo <i>et al.</i> (2013)                                                                          | <i>Streptomyces sp.</i> RM7011                                        |
| Wang <i>et al.</i> (2017)                                                                        | <i>Streptomyces tsukubaensis</i>                                      |

Adaptada de BARREIO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014.

Apenas a escolha da cepa não garante aumento na produção do fármaco, um aprofundamento no estudo dos meios produtivos se faz necessário. Neste caso, a proposta da rota de produção sintética do tacrolimo por Motamedi *et al.* (1996) e Motamedi e Shafiee (1998), juntamente com os estudos de *status* taxonômicos da *S. tsukubaensis* conduzidos por Martínez-Castro *et al.* (2011) e Martínez-Castro *et al.* (2013) e, ainda, o sequenciamento genômico da *S. tsukubaensis* NRRL 18488 reportado por Barreiro *et al.* (2012) ajudou a elucidar diversos nutrientes requeridos, bem como elementos regulatórios para a produção do fármaco. Os estudos levaram a utilização de precursores e estratégias para o incremento na produção do tacrolimo (MARTÍNEZ-CASTRO *et al.*, 2009; GORANOVIC *et al.*, 2012).

Baseando-se no trabalho de Motamedi e Shafiee (1998), os autores Turło *et al.* (2012) testaram no meio de produção compostos cíclicos de 6 membros com um nitrogênio como heteroátomo em sua estrutura, por exemplo a piridina e seus derivados. Esses tipos de anéis heterocíclicos são encontrados na estrutura do tacrolimo e ainda o ácido piridinocarboxílico, obtido pela  $\alpha$ -desaminação e ciclização da L-lisina, é incorporado à cadeia completa de acila na última fase da biossíntese do tacrolimo (TURŁO *et al.*, 2012). Outros compostos, supostos precursores, do tacrolimo em sua biossíntese são: propanol, ácido propiônico e propileno glicol (GAJZLERSKA, KURKOWIAK e TURŁO, 2015).

Além de compostos precursores e promotores de crescimento já citados, das variações de fontes de carbono e nitrogênio com o intuito de uma maior produção do fármaco, há também modificações genéticas realizadas no gênero *Streptomyces* (KIM e PARK, 2007; CHEN *et al.*, 2012), bem como estudos de metabolômica e proteômica (WANG *et al.*, 2017), que são ferramentas importantes para descrever perfis metabólitos e identificar biomarcadores associados com as aparentes diferenças metabólitos entre diversos metabolitos secundários (CHEN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017).

#### **2.4.2 Ciclo de crescimento bacteriológico**

O crescimento e a produção de metabólitos secundários são divididos em duas fases: a trofofase (do grego, *tropho*, nutriente), fase na qual o metabolismo primário

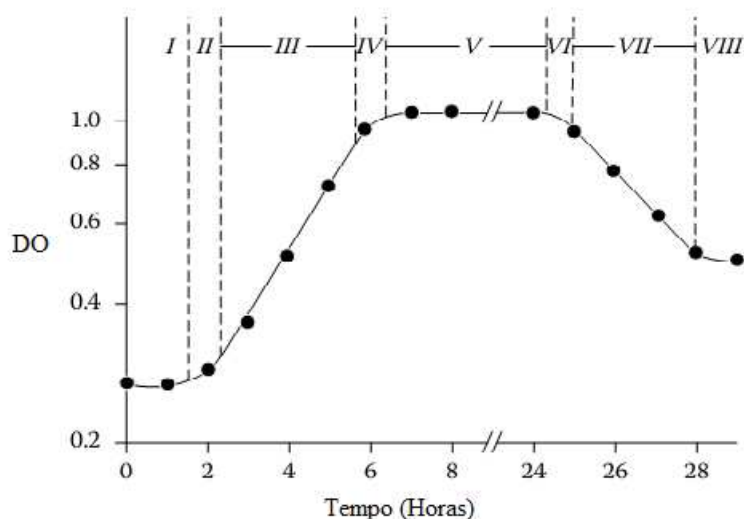
ocorre; e a idiofase (do grego, *idio*, peculiar) que durante esta, fase os metabólitos secundários peculiares a cada organismo são sintetizados (OKAFOR, 2007).

A Equação 2.1 é a básica utilizada para descrever crescimento microbiano. Ela implica que a razão da formação de biomassa ( $x$ ) altera-se em função do tempo ( $t$ ) e que razão da formação é diretamente proporcional a um fator particular ( $a$ ), como substratos de crescimento e temperatura, entretanto, é inversamente proporcional ao fator ( $b$ ), como inibidores. Ambos os fatores ( $a$ ) e ( $b$ ) são independentes do fator tempo (EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012).

$$\frac{dx}{dt} = \frac{ax}{b} \quad (2.1)$$

Em uma fermentação em modo batelada, inevitavelmente o crescimento bacteriológico atinge um ápice, e um ponto onde para de crescer e começa a decair, indicando a fase estacionária. A Figura 2.3 exemplifica uma curva de crescimento microbiano padrão para uma fermentação em batelada.

Figura 2.3 – Ciclo de crescimento microbiano padrão em fermentação do tipo batelada



Adaptada de KOLTER, SIEGELE, TORMO, 1993.

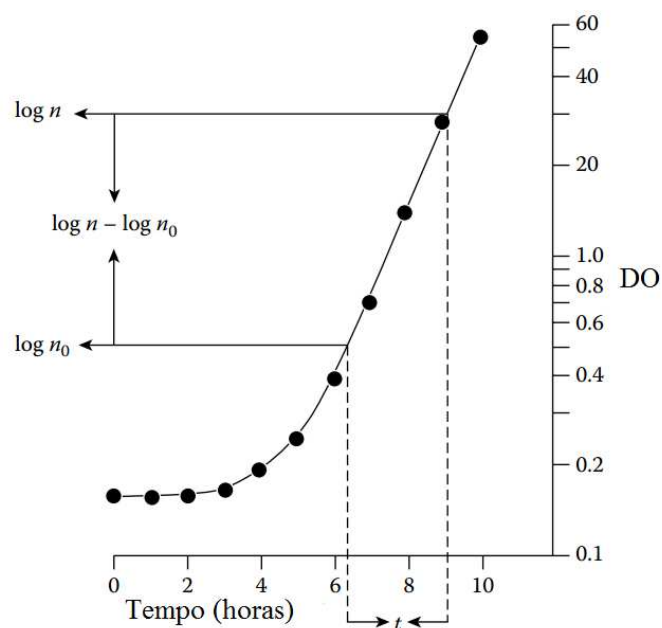
Observa-se na Figura 2.3 um número de diferentes fases no ciclo de crescimento, que podem ser diferenciados como (KOLTER, SIEGELE, TORMO, 1993; EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012):

- I. fase *lag*;
- II. fase de aceleração de crescimento;
- III. fase exponencial (ou fase logarítmica);
- IV. fase de desaceleração;
- V. fase estacionária;
- VI. fase de decaimento exponencial;
- VII. morte celular ou fase de sobrevida.

A fase *lag* corresponde ao adiamento da fase exponencial, onde as células se dividem à taxa constante. Na fase *lag* ocorre um processo biológico fundamental, a adaptação fisiológica da bactéria ao meio inserido, como a adaptação a fonte de carbono presente; adicionalmente, o microrganismo pode efetuar reparos em danos celulares e a síntese de componentes necessários para o crescimento. A fase de aceleração de crescimento, também conhecida como *lag* II, é o processo onde se inicia a geração de células (ROLFE *et al.*, 2012; MADAR *et al.*, 2013).

A Figura 2.4 apresenta a fase exponencial. Durante a fase exponencial as células crescem em tamanho e, se o meio prover os nutrientes necessários, as células se dividem e crescem (WAITES *et al.*, 2001; MADAR *et al.*, 2013).

Figura 2.4 – Determinação gráfica do tempo médio de geração durante cultivo em batelada



Adaptada de EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012.

A fase exponencial de crescimento bacteriológico pode ser descrito pela Equação (2.2).

$$\frac{\log(n) - \log(n_0)}{t} = \frac{\log(2)}{T} \quad (2.2)$$

onde ( $n$ ) é o número total de células após dado tempo ( $t$ ) desde o início da fermentação; ( $n_0$ ) é o número de células no início da fermentação; e ( $T$ ) é definido como o tempo médio de duplicação (WAITES *et al.*, 2001; EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012).

Ainda na fase exponencial ocorre a transformação das fontes primárias de carbono em precursores biossintéticos, que são utilizados em diversas rotas biossintéticas para a produção de monômeros (aminoácidos, ácidos graxos e açúcares), posteriormente transformados em um dado polímero (EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012).

Um dos fatores utilizados para caracterizar a fase exponencial de crescimento microbiano é a velocidade de crescimento específico ( $\mu$ ), que pode ser obtida pela Equação (2.3) (NIELSEN, 2012)

$$\mu = \frac{1}{n} \frac{dn}{dt} \quad (2.3)$$

A velocidade de crescimento específico se relaciona com o tempo médio de duplicação ( $T$ ) por meio da Equação (2.4) (EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012; NIELSEN, 2012).

$$\ln 2 = \mu T \quad (2.4)$$

Nos cultivos em batelada, ao decorrer de todo o processo de fermentação os substratos presentes no meio fermentativo são consumidos e, conseqüentemente ocorre a exaustão de um ou mais substratos necessários para os microrganismos, com isso inicia-se a fase estacionária, que pode ser expressa pela Equação (2.5), que apresenta o balanço entre crescimento e declínio celular (KOLTER, SIEGELE, TORMO, 1993).

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (2.5)$$

Por fim, atinge-se na curva a fase de declínio celular, que possui uma característica exponencial. Embora a razão de declínio celular seja relativamente mais lenta que a fase exponencial de crescimento. A Equação (2.6) descreve a fase de morte celular (MAIER, 2009).

$$\frac{dx}{dt} = -k_d x \quad (2.6)$$

em que ( $k_d$ ) representa a razão específica de morte celular.

Entretanto, mesmo na fase de declínio, ocorre que algumas células ainda se dividem e, em caso de algumas bactérias Gram-positivas, nota-se a esporulação, mas notadamente a perda é maior que o ganho em células viáveis à produção de metabolitos (MAIER, 2009; EL-MANSI, WARD e CHOPRA, 2012).

### 2.4.3 Regulação pela fonte de carbono

A natureza dos materiais utilizados para o meio de fermentação pode ser classificada como meio quimicamente definido ou meio complexo. Meio definido é composto de material químico puro, de proporções precisamente conhecidas, ao passo que meio complexo é formulado pela inclusão de ingredientes de origens naturais, e a composição precisa não é completamente conhecida (ZHANG e GREASHAM, 1999).

Usualmente a glicose é uma das fontes de carbono mais empregadas para o crescimento bacteriano e demais microrganismos. Há fontes de carbono conhecidas como ‘rápidas’ e ‘lentas’. Em meios contendo ambas as fontes, rápidas e lentas, ocorre que a fonte ‘rápida’ é utilizada para o crescimento celular e pouco ou muito pouco, metabólito secundário é produzido. Após essa assimilação primária, a fonte secundária de carbono é consumida para a produção dos metabólitos secundários (SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

O controle de metabólitos secundários se dá pela repressão da síntese de enzimas envolvidas no processo. Portanto, o emprego de substratos rapidamente assimiláveis, como a glicose, pode levar a uma menor produção de metabólitos secundários, bem

como ao acúmulo de metabólitos intermediários das rotas catabólicas (DEMAIN e FANG, 1995; OLAVO, 2006).

Kim *et al.* (2001) estudaram a repressão por glicose na produção do antibiótico actinorodina em *S. lividans*. Os autores reportaram que a biossíntese do fármaco, na bactéria estudada, está ligada condicionalmente a fonte de carbono presente no meio, e ainda que a glicose suprime o crescimento e a produção. Substituindo a glicose por glicerol, os autores alcançaram maior produção do fármaco.

A variedade de fármacos que possuem supressão por glicose reportados na literatura é extensa, apenas em antibióticos há mais de 20 exemplos, porém outros carboidratos também possuem influência comprovada na produção de fármacos, como o glicerol, maltose, manose, sucrose etc. Por exemplo, a glicose suprime a formação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a cefamicina C (LIBRIHI, LEFEBVRE e GERMAIN, 1988) e de policetídeos macrocíclicos (SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

#### **2.4.4 Regulação pela fonte de nitrogênio**

Assim como o carbono interfere diretamente na biossíntese de metabólitos secundários, o nitrogênio também o faz. Algumas rotas metabólicas são afetadas negativamente por fontes de nitrogênio que favorecem o crescimento celular, como exemplo, sais de amônio (DEMAIN e FANG, 1995). Fontes complexas de nitrogênio contendo proteínas, como o farelo de soja e peptonas possuem efeito benéfico para a produção de metabólitos secundários, se comparados a fontes definidas e de rápida assimilação, como aminoácidos. Entretanto há poucas informações sobre os mecanismos negativos envolvidos pelo íon amônio em biossíntese de metabolitos (AHARONOWITZ, 1980).

O local de maior incidência de bactérias do gênero *Streptomyces*, o solo, tipicamente é um ambiente pobre em nitrogênio e, conseqüentemente, diversas rotas catabólicas de nitrogênio são expressas, desenvolvendo um senso de mecanismo regulatório que permite o uso da melhor fonte de nitrogênio (SANCHEZ e DEMAIN, 2002; DYSON, 2009). Na maior parte das bactérias, a enzima-chave para o metabolismo do nitrogênio, a glutamina sintetase (GS), possui duas funções, na biossíntese da l-glutamina e do nitrogênio (DYSON, 2009).

Mishra e Verma (2012) realizaram uma série de estudos de otimização de meio de produção do tacrolimo em *Streptomyces* sp., onde usaram fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, como sulfato de amônia, nitrato de amônia, peptona e farelo de soja. Os autores, por meio de delineamento experimental, avaliaram as interações entre as fontes citadas. Percebe-se que, isoladamente como fonte de nitrogênio, o sulfato de amônia obteve a maior produção, 82,5 mg L<sup>-1</sup>, porém a associação do farelo de soja a L-lisina resultou em incremento de 1,73 vezes a produção anterior.

#### **2.4.5 Regulação pela fonte de fosfato**

A produção de enzimas e metabólitos secundários é regulada por fontes inorgânicas de fosfato. Entretanto, no solo, fontes inorgânicas de fósforo se apresentam como o fator limitante ao crescimento bacteriológico, o que levou o sistema biológico bacteriano a evoluir diversas maneiras de respostas para a modulação do fosfato requerido ou mesmo a aprimorar seu uso (SÁNCHEZ e DEMAINE, 2002).

Na produção da candidicina por *S. griseus* o fosfato é consumido na fase de crescimento celular, quantidades extracelulares de fosfato ficam bem baixas em toda a idiofase (MARTIN e DEMAINE, 1980). Aharonowitz e Demain (1977) estudaram o efeito do fosfato de potássio na produção da cefalosporina em *S. clavuligerus*. Os autores concluíram que em altas concentrações de fosfato de potássio há extenso crescimento celular, porém a produção do fármaco fica afetada.

O fosfato regula a biossíntese de antibióticos, mesmo os pertencentes a grupos funcionais diferentes, como peptídeos antimicrobianos cíclicos, macrolídeos e tetraciclina (SÁNCHEZ e DEMAINE, 2002). De acordo com Martin e Demain (1980), em concentrações de fosfato acima de 10 mM, alguns antibióticos têm sua produção suprimida. Para que isso não ocorra, a fermentação deve, preferencialmente, ser conduzida em baixas concentrações de fosfato livre. Outros meios de evitar o efeito negativo por excesso de fosfato incluem mutações genéticas de cepas produtoras de fármacos (SÁNCHEZ e DEMAINE, 2002). O fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico são fontes comuns de fosfato empregadas na produção do tacrolimo (MISHRA e VERMA, 2012; TURLO *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2013).

Desde a publicação original da produção do tacrolimo por Kino *et al.* (1987a) diversos grupos de pesquisa se esforçaram elevar a produção do tacrolimo tanto pelo

aperfeiçoamento genético das cepas escolhidas, como anteriormente citado, além de enriquecimento e mudança de meios de produção. A Tabela 2.7 resume meios de produção utilizados, expondo as fontes de carbono, nitrogênio e fosfato.

Tabela 2.7 – Fontes de carbono, nitrogênio e fosfato para a produção do tacrolimo

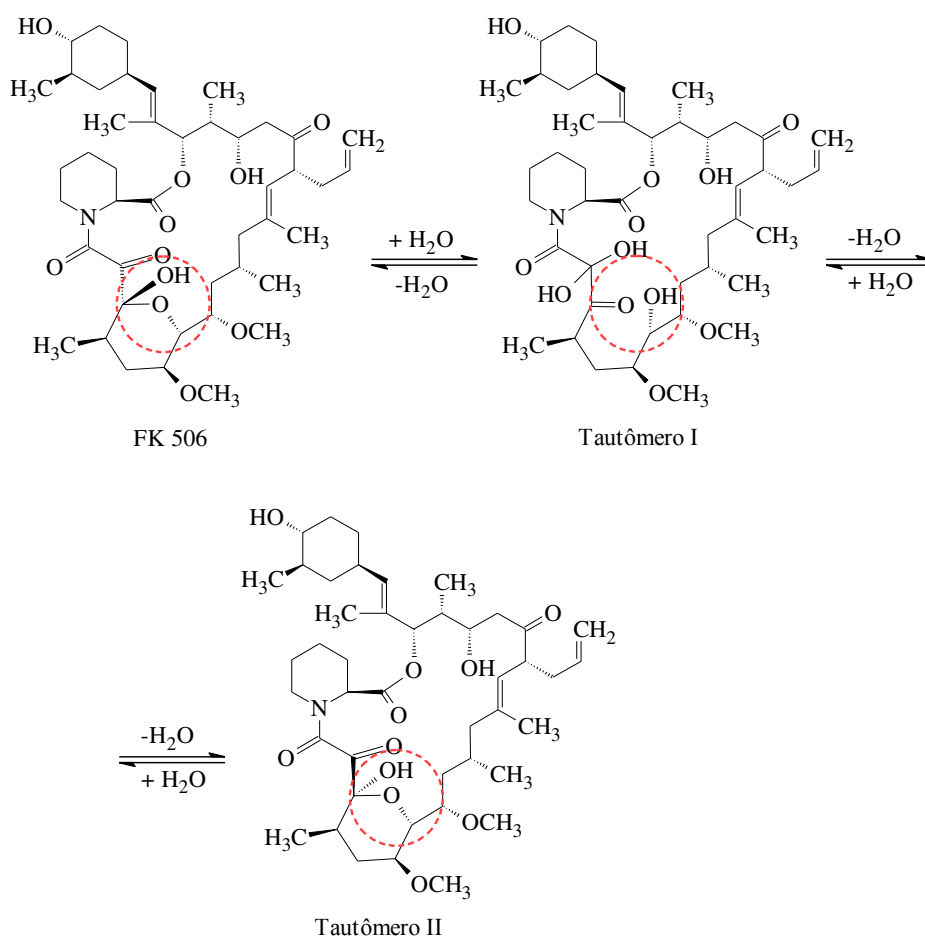
| Referência                    | Meio de produção                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Produção média (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Turlo <i>et al.</i><br>(2012) | maltose (2%), peptona de soja (3%), licor<br>íngreme de milho (1%), MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O<br>(0,05%), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2%), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,4%),<br>CaCO <sub>3</sub> (0,3%), pH 7,2 e 30 °C<br>(ácido picolínico, ácido pipecólico, ácido<br>nicotínico e nicotinamida – 0,001, 0,0025,<br>0,005 e 0,01%)                                                                                 | 33,28                                |
| Mishra e Verma<br>(2012)      | óleo de soja (1,5%), farelo de soja (1,2%),<br>CaCO <sub>3</sub> (0,35%), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,05%), pH 7 e<br>temperatura 28°C. (L-lisina 0,1%).                                                                                                                                                                                                                                                                | 135,6                                |
| Huang <i>et al.</i><br>(2013) | amido (6%), extrato de levedura (0,2%),<br>peptona (0,25%), farelo de soja (0,5%),<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,05%), MgSO <sub>4</sub> (0,05%), CaCO <sub>3</sub><br>(0,05%), pH 7,0 e 28 °C.                                                                                                                                                                                                                                        | 34,3                                 |
| Wang <i>et al.</i><br>(2017)  | dextrana (4%), glicose (2%), NaCl (0,1%),<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,2%), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1%), CaCO <sub>3</sub><br>(0,2%), MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,1%), MnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O<br>(0,0001%), ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,0001%), FeSO <sub>4</sub><br>(0,0001%), MOPS (0,5%), pH 6,5, 28 °C<br>(óleo de soja (0,1%) adicionado após 24h de<br>cultivo) | 56,35                                |

## 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DO TACROLIMO

O tacrolimo exibe propriedade estrutural diferenciada. O fármaco apresenta duas heterogeneidades conformacionais, sendo a primeira a isomerização cis-trans que

envolve a restrição rotacional da amida ligada à porção pipecólica. Mierke *et al.* (1991) e Namiki *et al.* (1993) elucidaram a segunda heterogeneidade conformacional do tacrolimo que, em solução aquosa, epimeriza para o tautômero I (cis) que é convertido para o tautômero II (cis-trans) alcançando um equilíbrio contendo as três formas, como apresentado na Figura 2.5 (SOUZA, 2012).

Figura 2.5 – Tacrolimo, tautômero I e tautômero II, processo de epimerização



Adaptada de AKASHI *et al.* 1996.

As mudanças conformacionais do tacrolimo requerem uma modesta energia, ao redor de  $3 \text{ Kcal mol}^{-1}$ , necessita-se de mais energia para ligar o fármaco a FKBP que para dissociar. A associação com a FKBP, que confere a atividade imunossupressora ao fármaco, é associada à conversão cis-trans (AKASHI *et al.*, 1996; ROSEN *et al.*, 1990; VAN DUYNE *et al.*, 1991).

A cromatografia líquida de alta eficiência é reconhecidamente uma ferramenta importante dentro das famílias de técnicas de separação, uma vez que ela propicia

separar misturas que contêm grande número de compostos com alta similaridade (JARDIM, COLLINS E GUIMARÃES, 2006). Para a quantificação de macrolídeos imunossupressores há uma diversidade de métodos propostos na literatura, incluindo detectores com ultravioleta (UV) ou com espectrometria de massas (LC-MS). Em geral, tais métodos estão focados em monitorar fármacos imunossupressores residuais em fluidos corporais. Porém, tais métodos podem não ser aplicados para monitorar a produção de fármacos por rota de biossíntese, isso devido a similaridades do tacrolimo com outros macrolídeos produzidos, e a possível presença dos isômeros (DAI *et al.*, 2006; SALM, TAYLOR e ROONEY, 2008; PARK *et al.*, 2009).

Amostras provenientes de um caldo fermentado podem apresentar uma composição variada, desde água, proteínas, sais, solventes a coprodutos de valor agregado, como a ascomicina que é um coproduto conhecido na produção do tacrolimo (AKASHI *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 2011; BARREIRO e MARTÍNEZ-CASTRO, 2014).

O preparo das amostras é uma etapa crucial para que o método analítico tenha bom desempenho. Na literatura é possível encontrar um conjunto de operações que definem o método descrito por cada autor. De modo genérico, à amostra coletada da fermentação é adicionado um solvente orgânico (acetona e acetato de etila) na proporção 1:1; após transcorrer certo tempo, a amostra é filtrada em papel filtro e/ou membrana (0,44 µm), centrifugada e então injetada no *HPLC* (JUNG *et al.*, 2009; SINGH e BEHERA, 2009; TURLO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017).

Chen *et al.* (2012) realizaram coletas periódicas de amostras, 2 ml de volume, no decorrer da fermentação. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 12.000 rpm. Ao sobrenadante, adicionava-se 2 mL de acetato de etila, ao passo que a micela foi extraída com 2 mL de acetona. Os extratos orgânicos foram combinados e evaporados em pressão reduzida, até a formação de um 'óleo' de tom amarelo, e então redissolvido em acetonitrila e injetado no *HPLC*.

A epimerização do tacrolimo, como anteriormente citada, ocorre por dois mecanismos, e um deles ocorre em solução aquosa. Uma vez que a fermentação ocorre em meio aquoso, a quantificação do fármaco durante o processo fermentativo seria comprometida. Com isso, um método analítico rápido e robusto faz-se necessário (WANG, MAGILL e VICENT, 2005).

Nishikawa *et al.* (1993) analisaram os efeitos da variação de temperatura na cinética de conversão dos tautômeros do tacrolimo. Os autores utilizaram uma coluna de

sílica recoberta com um grupo ocatadecil como fase estacionária, acetonitrila e água (75:25 v/v) como fase móvel. As temperaturas estudadas variaram de 0 a 60 °C. A conclusão é que a baixas temperaturas não é possível se observar um pico de tacrolimo apenas no cromatograma, ao passo que a 60 °C observa-se o pico do tacrolimo bem definido.

Akashi *et al.* (1996) conduziram estudos com variação da proporção de água presente na fase móvel, variação de pH e temperatura. A fase estacionária utilizada no trabalho consistia em uma sílica recoberta com um grupo octadecil. A fase móvel era uma mistura ternária de acetonitrila/água/ácido fosfórico (60:40:1 v/v/v). Percebe-se no trabalho dos autores que na medida em que se aumenta a proporção de água no sistema, a quantificação do tacrolimo diminui e a de seus tautômeros aumenta.

A Tabela 2.8 apresenta um resumo dos métodos analíticos utilizados por alguns autores. Tais métodos são baseados nos estudos de Nishikawa *et al.* (1993) e Akashi *et al.* (1996).

Tabela 2.8 – Resumo dos métodos analíticos empregados pelos autores para a quantificação de tacrolimo produzido por fermentação

| Autores                    | Método analítico                                                                                                                                                       |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Singh e Behera (2009)      | coluna C18, vazão 2,0 mL min <sup>-1</sup> , temperatura 50 °C, fase móvel composta por acetonitrila/água (60:40, v/v), detecção em 210 nm.                            |
| Jung <i>et al.</i> (2011)  | coluna Sinergy Polar RP, vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> , temperatura 55 °C, fase móvel composta por acetonitrila/água (50:50, v/v), detecção a 220 nm.                |
| Turlo <i>et al.</i> (2012) | coluna C18, vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> , temperatura 60 °C, fase móvel composta por acetonitrila/água (75:25, v/v), detecção em 214 nm.                            |
| Huang <i>et al.</i> (2013) | coluna C18, vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> , temperatura 60 °C, fase móvel composta por 0,1 % de ácido fosfórico e acetonitrila/água (65:35, v/v), detecção em 210 nm. |

# Capítulo 3

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Material biológico

A cepa de bactérias *Streptomyces tsukubaensis* foi utilizada para obter o fármaco tacrolimo, adquirida junto ao Instituto Leibniz DSMZ – Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares, onde encontra-se armazenada sob a sigla DSM 42081. A cepa foi encaminhada à Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, onde se encontra preservada sob o código CBMAI – 1832.

#### 3.1.2 Meios para cultivo em placa e meios de pré-inoculação e inoculação

O meio de cultivo utilizado para crescimento e posterior armazenamento da cepa foi o recomendado pela DSMZ, como descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Meio *Streptomyces* GYM\*

| Composto            | Proporção (g) |
|---------------------|---------------|
| Glicose             | 4,0           |
| Extrato de levedura | 1,0           |
| Extrato de malte    | 10,0          |
| CaCO <sub>3</sub>   | 2,0           |
| Agar                | 12,0          |
| Água destilada      | 1000**        |

\*pH ajustado para 7,2 antes da adição de ágar. \*\*mililitros de água

Os meios utilizados para pré-inoculação, inoculação e fermentação foram descritos em Turlo *et al.* (2012) e Mishra e Verma (2012) e estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Relação de compostos utilizados para a pré-inoculação, inoculação e fermentação

| Compostos                          | CAS/REF     | Fornecedor     |
|------------------------------------|-------------|----------------|
| Glicose anidra                     | 492-62-6    | Dinâmica®      |
| D(+) Maltose puríssima             | 6363-53-7   |                |
| Fosfato de potássio monobásico     | 7778-77-0   |                |
| Fosfato de potássio dibásico       | 7758-11-4   |                |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | 10034-99-8  |                |
| Carbonato de cálcio                | 471-34-1    |                |
| L-lisina                           | 657-27-2    |                |
| Peptona de soja                    | K25-612501* | KASVI          |
| Extrato de malte                   | K25-611006* |                |
| Extrato de levedura                | K25-611005* |                |
| Agar                               | K25-611001* |                |
| Licor íngreme de milho             | 66071-94-1  | Sigma-Aldrich® |
| Ácido picolínico                   | 98-98-6     |                |

\* referência do fornecedor

### 3.1.3 Equipamentos, solventes, coluna analítica e padrão do tacrolimo

As fermentações foram conduzidas no Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renováveis no Departamento de Engenharia de Processos na Universidade Estadual de Campinas, em incubadora do tipo *shaker* orbital (Shel Lab, USA). As amostras (10 mL) coletadas ao longo da fermentação foram filtradas em papel filtro (INLAB Tipo 10, porosidade 3,0 µm) e evaporadas em pressão reduzida em um evaporador rotativo da marca Fisatom e Modelo 803, por fim centrifugadas a 10 °C (centrífuga Hettich, modelo Rotina 420R).

A quantificação do tacrolimo foi realizada no Laboratório de Processos de Transferência de Massa do Departamento de Engenharia de Processos da Universidade

Estadual de Campinas. Para quantificar o tacrolimo produzido, 20µl de cada amostra era injetada em um cromatografo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, composto por uma bomba (LC-20AT), um detector UV-Vis (SPD-20A) e uma placa controladora (CBM-20A). A fase móvel utilizada consistia em uma mistura binária de acetonitrila (Scharlau, grau HPLC) e água deionizada (18,2 Ω), como fase estacionária foi utilizada a octadecilsilano (C18), empacotada originalmente em uma coluna ThermoQuest *Hyperbond* (300 × 3,9 mm). A temperatura de operação mantida a 60 ° C, com o auxílio de um banho termostático da marca Quimis (Q-2142M) com sensibilidade de ± 0,1 ° C. As amostras foram monitoradas em 210 nm.

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

### 3.1.4 Materiais para a determinação de açúcares

O consumo de maltose ao longo da fermentação foi determinando pelo método de Somogyi-Nelson (SHAFFER e WILLIAMS, 1935; NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945a; SOMOGYI, 1945b; SOMOGYI, 1951) e os materiais utilizados estão listados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Lista de materiais para a determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson

| Composto                                           | CAS        | Fornecedor       |
|----------------------------------------------------|------------|------------------|
| Carbonato de sódio anidro                          | 497-19-8   | Êxodo Científica |
| Bicarbonato de sódio                               | 144-55-8   |                  |
| Sulfato de sódio anidro                            |            |                  |
| Tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado | 304-59-6   | Vetec            |
| Sulfato de cobre pentahidratado                    | 7758-99-8  | Synth            |
| Ácido sulfúrico concentrado                        | 7664-93-9  |                  |
| Molibdato de amônio anidro                         | 12027-67-7 | Ecibra           |
| Arseniato dibásico de sódio anidro                 | 7784-46-5  | Exata            |

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Placas de Petri

Os componentes e proporções usados para a confecção dos meios utilizados para as placas de Petri seguiram a Tabela 3.1. A mistura dos componentes, com exceção ao ágar, teve seu pH ajustado para 7,2, com NaOH (2M) e solução de cloreto de potássio saturada com AgCl (3M). Após a correção, adicionou-se o ágar à mistura e aquecida sob agitação, para completa solubilização. O meio completamente solubilizado era esterilizado em autoclave (aproximadamente 120 °C) por 20 minutos.

O meio esterilizado era vertido em placas de Petri, de tal maneira a formar uma camada homogênea de aproximadamente 1 cm de espessura. As placas foram inoculadas com o auxílio de uma alça contendo amostra das bactérias. Então, as placas eram lacradas e levadas a estufa incubadora por 5-7 dias, a 28 °C, para crescimento das colônias.

### 3.2.2 Pré-inoculação e inoculação

O pré-inóculo foi preparado de acordo com os meios e proporções descritos em Turlo *et al.* (2012), como descrito na Tabela 3.4. Posteriormente ao preparo, o meio era esterilizado em autoclave e somente utilizado após seu resfriamento. Eram preparados 3 *erlenmeyers* de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido, e uma alça de bactérias era transferida assepticamente para 2 *erlenmeyers*; 1 era usado como controle, ou seja, não era inoculado, mas utilizado para averiguar possíveis contaminações. Os *erlenmeyers* eram levados à estufa incubadora por 24 horas, sob agitação de 110 rpm e 28 °C. Uma alíquota era coletada após 24 horas de inóculo, e a densidade ótica (DO<sub>600</sub>) avaliada a 600 nm (INNES e ALLAN, 2001; JUNG *et al.*, 2009).

Tabela 3.4 – Meio de pré-inoculação e inoculação\*

| Composto            | Proporção (%) |
|---------------------|---------------|
| Extrato de malte    | 0,6           |
| Glicose             | 0,6           |
| Maltose             | 0,6           |
| Extrato de levedura | 0,12          |

\*pH ajustado para 7.2

O meio líquido preparado para o inóculo foi idêntico em compostos e proporções ao meio de pré-inoculação. Para esta etapa foram utilizados *erlenmeyers* de 500 mL, contendo 135 mL do meio e 15 mL de meio oriundos do pré-inóculo (10 % do volume total). Os *erlenmeyers* foram incubados por 24 horas, a 110 rpm e 28 °C. Transcorridas as 24 horas, uma alíquota era retirada e sua densidade ótica avaliada, procedimento idêntico ao seguido para a etapa de pré-inoculação.

Assim como no pré-inóculo, 3 *erlenmeyers* eram preparados, sendo 2 inoculados com bactérias e 1 apenas para controle. O *erlenmeyer* que apresentasse maior densidade ótica era utilizado para a próxima etapa: a fermentação. O segundo frasco inoculado era utilizado para armazenar linhagens de bactérias em criotubos. Cada criotubo continha 3,2 mL do meio inoculado e 0,8 mL de glicerol. Os criotubos foram mantidos em *ultrafreezer* a -80 °C.

### 3.2.3 Fermentação em frascos

Baseando-se na cepa de bactérias utilizada, o meio escolhido para a produção neste trabalho foi o de Turlo *et al.* (2012). Entretanto, usou-se também o ácido picolínico (0,0025%) e L-lisina (0,1%) como aditivo. Estes são citados na literatura como precursores e agentes de crescimento (TURLO *et al.*, 2012; MISHRA e VERMA, 2012). Com isso pode-se compor os meios que foram utilizados para a produção do fármaco nesta Tese. Tais meios foram denominados MPL (maltose, peptona de soja e licor íngreme de milho) e GPL (glicose, peptona de soja e licor íngreme de milho), observa-se suas composições na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Composição e parâmetros utilizados para a produção do tacrolimo

| Meio  | Composição e parâmetros                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MPL * | maltose (2%), peptona de soja (3%), licor íngreme de milho (1%),<br>MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,05%), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2%), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,4%), CaCO <sub>3</sub> (0,3%).<br>Fermentação conduzida por 10 dias, a 28 °C, 130 rpm, e pH inicial de 7,2. |
| GPL   | glicose (2%), peptona de soja (3%), licor íngreme de milho (1%),<br>MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,05%), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2%), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,4%), CaCO <sub>3</sub> (0,3%).<br>Fermentação conduzida por 10 dias, a 28 °C, 130 rpm, e pH inicial de 7,2  |

\* foi realizada uma fermentação com esse meio a 30 °C e 110 rpm.

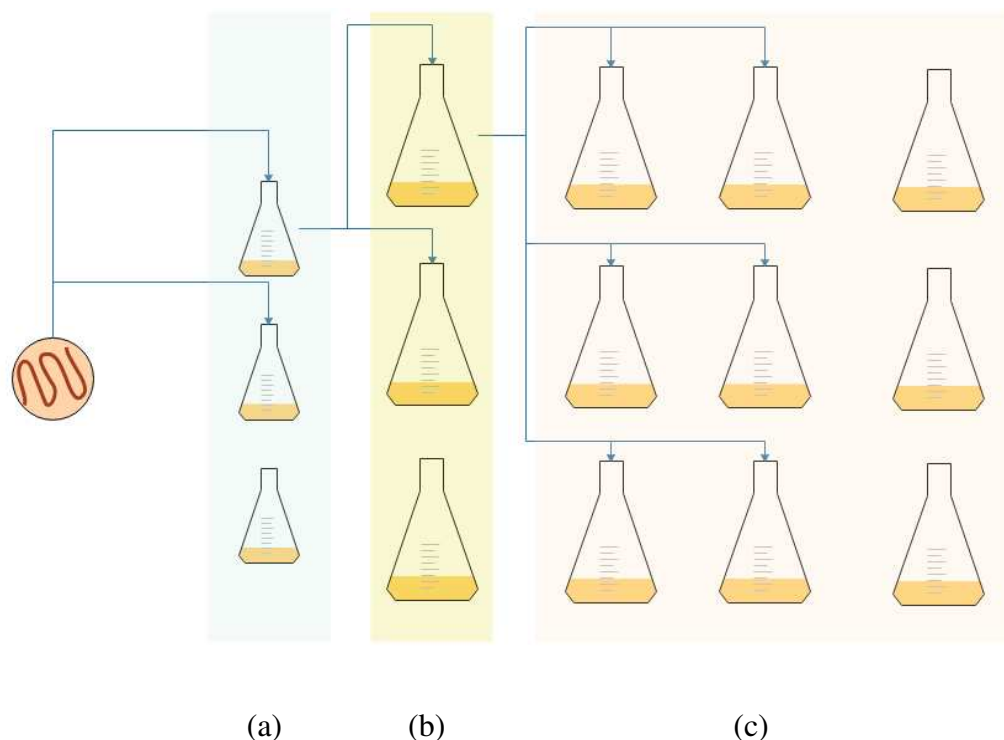
Os meios possuíam maltose e glicose como fontes primárias de carbono e, como fonte de nitrogênio, peptona de soja e licor íngreme de milho. A razão carbono/nitrogênio nominal encontrada em cada meio era de 0,5:1,0. Com o intuito de avaliar os efeitos da razão nominal de carbono/nitrogênio foram preparados meios com diferentes razões C:N, por meio da variação da porcentagem da fonte de carbono no meio. As demais razões C:N utilizadas foram de 0,25:1, 0,75:1 e 1:1. A porcentagem da fonte de nitrogênio e demais componente foram mantidos como descritos na Tabela 3.5.

O preparo dos meios se deram como o pré-inóculo e inóculo, 3 *erlenmeyers* eram preparados, porém apenas 2 inoculados, 1 apenas como controle, para averiguar possíveis contaminações. Todos os ensaios foram realizados em frascos *erlenmeyer* de 500 mL, os quais foram preenchidos com 225 mL de meio líquido e 25 mL do inóculo, correspondendo a 10 % do volume total em cada frasco *erlenmeyer*. Os frascos foram posteriormente condicionados em incubadora por 10 dias, a 28 °C e 130 rpm de agitação. Desde o momento da inoculação dos frascos destinados a fermentação, uma alíquota era coletada assepticamente e periodicamente a cada 24 horas.

A Figura 3.1 representa como ocorreu a fermentação a partir da placa até a produção em frascos. A etapa (a) na Figura 3.1 representa o processo inicial, pré-inoculação, com frascos de 250 mL contendo o meio e as bactérias provenientes da placa; a etapa (b) representa a etapa de inoculação, por fim; a etapa (c) onde os frascos eram incubados por 10 dias, em condições previamente citadas.

Como anteriormente citado, as fontes primárias de carbono foram a maltose e a glicose, e a fonte de nitrogênio a peptona de soja e o licor íngreme de milho. Entretanto, fontes complexas de nitrogênio possuem carbono em sua estrutura e, com o intuito de entender as razões C/N utilizadas nesta Tese, foram realizados ensaios de carbono orgânico total e teor de nitrogênio total (Kjeldahl) em ambas as fontes de nitrogênio. Esses ensaios laboratoriais foram conduzidos no Centro de Qualidade Analítica – CQA-Campinas.

Figura 3.1 – Representação esquemática da pré-inoculação, inoculação e fermentação



### 3.2.4 Curva analítica

Para a determinação do tacrolimo presente nas amostras coletadas ao decorrer da fermentação é necessário uma curva analítica. Tal procedimento consiste em injetar amostras do padrão em diferentes concentrações, e assim, construir um gráfico na forma de concentração vs área.

A curva de calibração para este trabalho foi feita a partir de uma amostra padrão de tacrolimo de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  e será apresentada no Capítulo 4. A solução padrão foi feita por meio da dissolução de 50 mg do padrão de tacrolimo em 50 mL de uma solução binária de acetonitrila e água (60:40 v/v). A solução mãe de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foi diluída nas seguintes concentrações: 5, 15, 25, 50, 100 e  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . O volume de cada amostra injetada era de  $20 \text{ } \mu\text{L}$ , e avaliada em 210 nm, com fase móvel constituída de acetonitrila e água (60:40 v/v) e fase estacionária (C18), e temperatura controlada em  $60 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Cada amostra foi injetada em triplicata, e a média aritmética foi utilizada para a construção da curva analítica.

### 3.2.5 Preparo das amostras e método analítico

Para avaliar o crescimento bacteriológico e a produção do fármaco, logo após a inoculação do meio de fermentação com as bactérias, uma alíquota de 10 mL era coletada e, periodicamente, a cada 24 horas, coletava-se outra alíquota de mesmo volume, iniciando no tempo 0 hora até 240 horas. Às amostras adicionava-se 10 mL de acetona, com o intuito de extrair o tacrolimo intracelular e, ainda, interromper o processo fermentativo (TAKESHI *et al.*, 1994; TURŁO *et al.*, 2012). As amostras repousavam a temperatura ambiente por um período de, no mínimo, 5 horas, e então, eram filtradas em papel filtro previamente pesado. O filtrado era evaporado em pressão reduzida até a formação de um óleo de cor amarela. Ao óleo, adicionava-se 3,5 mL da fase móvel, o sobrenadante gerado com a separação das fases era coletado, posteriormente centrifugado e armazenado para análise em HPLC. O papel filtro com células era lavado com 100 mL de água destilada e levado à estufa a 70 °C por 24 horas.

Com os resultados de crescimento bacteriológico e a produção do fármaco é possível obter um importante dado, a produção específica (p.e.). A produção específica é dada pela razão da produção máxima de tacrolimo e a produção de biomassa no referido tempo, e tem por unidade massa de tacrolimo por massa de biomassa ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

O tratamento das amostras baseou-se em procedimentos encontrados na literatura, principalmente Singh e Behera (2009), Jung *et al.* (2011), Mishra e Verma (2012); Turło *et al.* (2012), Martínez-Castro *et al.* (2013). Para evitar problemas com as heterogeneidades conformacionais apresentadas na Figura 2.5, utilizou-se uma combinação dos métodos descritos na Tabela 2.8. A coluna utilizada neste trabalho era empacotada com sílica C18, a fase móvel composta por acetonitrila e água, na proporção de 60:40 (v/v), vazão constante de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 60 °C e detecção em 210 nm, o volume de injeção era de 20 µL.

### 3.2.6 Determinação de maltose

A determinação do consumo de maltose ao longo da fermentação foi realizada pelo método colorimétrico de Somogyi-Nelson (SHAFFER e WILLIAMS, 1935; NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945a; SOMOGYI, 1945b; SOMOGYI, 1951; MALDONADE *et al.*, 2013).

Maldonado *et al.* (2013), pesquisadores e técnicos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), publicaram um Comunicado Técnico com o protocolo para a determinação de maltose pelo método de Somogyi-Nelson. O procedimento descreve o preparo da solução Somogyi-Nelson I (SN-I) e Somogyi-Nelson II (SN-II). A solução SNI-I consiste em dissolver 4 g de sulfato de cobre anidro ( $\text{CuSO}_4$ ), 24 g de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 16 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), 12 g de tartarato de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e 18 g de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) em 600 mL de água destilada e aferir o volume para 1 L em um balão volumétrico. A solução deve permanecer em repouso por um dia em ambiente escuro. Após esse tempo, deve-se filtrar a solução em papel filtro.

O reagente SN-II é composto por duas soluções distintas: A e B. O preparo da solução A consiste na dissolução de 50 g de molibdato de amônio anidro,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , em 900 mL de água destilada e, lentamente, adicionando-se 42 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado. A solução B é composta por 6 g de arseniato dibásico de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) dissolvidos em 50 mL de água destilada. As soluções A e B devem ser misturadas e deixadas em repouso, encubando por 24 horas a 37 °C. A solução SN-II deve ser armazenada em frasco âmbar e tem um prazo de validade de 30 dias.

As amostras coletadas ao longo da fermentação foram centrifugadas logo após a coleta. O sobrenadante gerado com a centrifugação, aproximadamente 2 mL, foi refrigerado a -10 °C. A análise pelo método de Somogyi-Nelson requer 500  $\mu\text{L}$  de amostra, este volume era transferido para um tubo de ensaio ao qual adicionava-se 2 mL da solução SN-I, o tubo era agitado e condicionado em banho com água fervente por 6 minutos. Transcorrido o tempo, resfriava-se o tubo em banho de água/gelo e adicionava-se 2 mL da solução SN-II, o tubo era deixado em repouso por 5 minutos. Por fim, ao tubo foram adicionados 25 mL de água destilada, agitado vigorosamente e a leitura realizada a 540 nm. A amostra correspondente ao padrão inicial de leitura (branco) consistia em substituir o 500  $\mu\text{L}$  da amostra por 500  $\mu\text{L}$  de água destilada.

A concentração foi obtida com o auxílio de uma curva de calibração, apresentada no Apêndice A. A curva foi construída à semelhança do procedimento descrito para a determinação da maltose. Para tal, uma solução padrão de maltose com concentração 2 g  $\text{L}^{-1}$ , foi diluída entre 0 e 2,0 g  $\text{L}^{-1}$  com passo de 0,4 g  $\text{L}^{-1}$ . As amostras foram feitas em triplicatas e as leituras realizadas em 540 nm.

### 3.2.7 Determinação de glicose

O consumo da glicose ao longo do processo fermentativo foi monitorado por meio do método enzimático colorimétrico da marca Laborclin (KEILIN e HARTREE, 1948). Assim como para a determinação da maltose, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado e imediatamente resfriado a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a análise de cada amostra coletada, uma alíquota de  $10\text{ }\mu\text{L}$  era separada. À amostra adicionava-se  $1\text{ mL}$  da solução do método enzimático. A amostra então era incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após rápida agitação e resfriamento, a absorbância foi lida em  $505\text{ nm}$  em espectrofotômetro digital UV-Vis, marca Geneys-10 UV.

Assim como ocorreu com a determinação da maltose, com a glicose também foi realizado uma curva de calibração, nas concentrações entre 0 e  $2,0\text{ g L}^{-1}$ , com passo de  $0,4\text{ g L}^{-1}$ .

# Capítulo 4

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

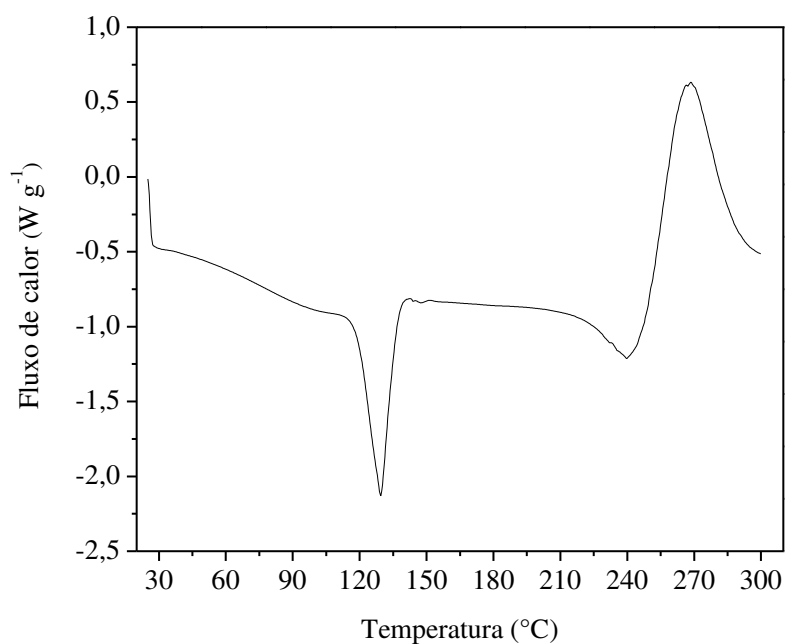
### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE TACROLIMO

#### 4.1.1 Análises térmicas e calorimétricas

O padrão do tacrolimo foi analisado no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) – Universidade Estadual de Campinas. Para a caracterização do padrão de tacrolimo foram realizados os testes de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).

A Figura 4.1 apresenta a curva de DSC do padrão do tacrolimo, realizada entre 25-300 °C, com taxa de aquecimento de 20 °C min<sup>-1</sup>, em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50,0 mL min<sup>-1</sup> e massa inicial de 5,2870 mg.

Figura 4.1 – Curva de DSC do padrão do tacrolimo

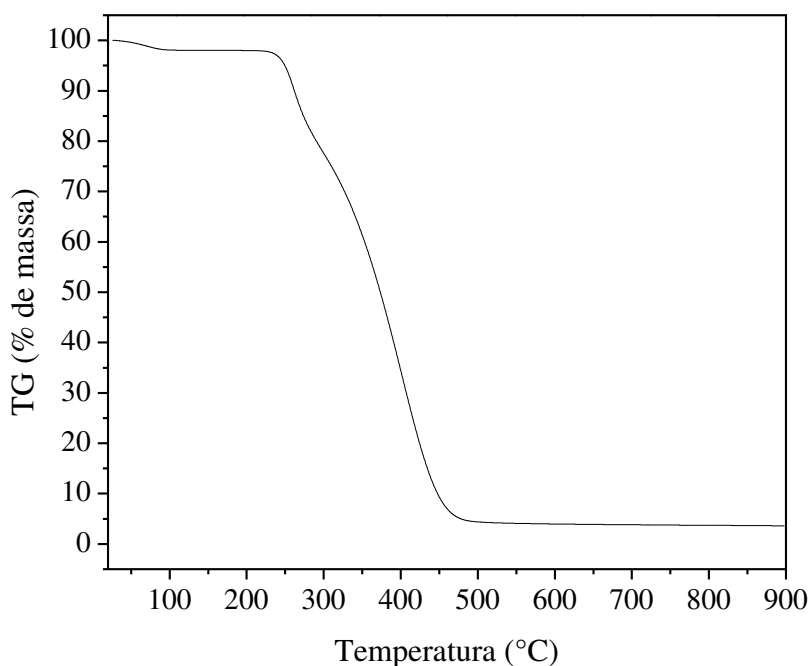


Nota-se na Figura 4.1, próximo a 90 °C, um evento endotérmico de pequena intensidade, tal evento está associado à desidratação da água presente na estrutura do tacrolimo monohidratado. O evento endotérmico, evidenciado em 129,54 °C representa o ponto de fusão do tacrolimo. O evento endotérmico, associado à evaporação, situa-se em 266,18 °C (TANAKA *et al.*, 1987; YAMASHITA *et al.*, 2003; JOE *et al.*, 2010; BÖER *et al.*, 2013).

A análise térmica de TGA é utilizada com a finalidade de medir a variação de massa de uma dada substância em função da temperatura. Tal teste é realizado em uma atmosfera controlada, com rampa de aquecimento previamente determinada. Na área farmacológica, de acordo com Oliveira, Yoshida e Gomes (2010), a TG tem por finalidade a determinação de pureza do composto, umidade, identificação de polimorfismo e estudo de estabilidade e cinética de degradação de fármacos e medicamentos.

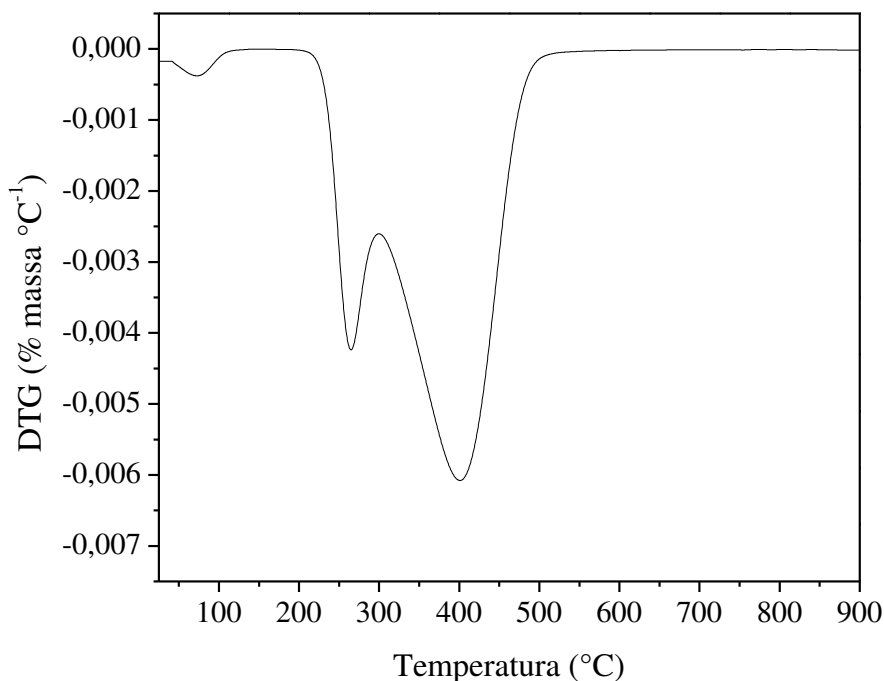
A curva termogravimétrica do padrão do tacrolimo foi realizada em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min<sup>-1</sup>; entre 25-300 °C com uma taxa de aquecimento de 20 °C min<sup>-1</sup>; a massa utilizada na análise foi de 9,6177 mg. A curva está representada na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Curva termogravimétrica do padrão de tacrolimo



De acordo com Böer *et al.* (2013) a curva termogravimétrica derivada (DTG) do padrão de tacrolimo apresenta 4 eventos térmicos característicos. Os autores realizaram testes em 4 medicamentos diferentes de tacrolimo, com taxas variadas de aquecimento. A Figura 4.3 apresenta a DTG do padrão de tacrolimo utilizado nesta Tese.

Figura 4.3 – Curva termogravimétrica derivada do padrão de tacrolimo (DTG)

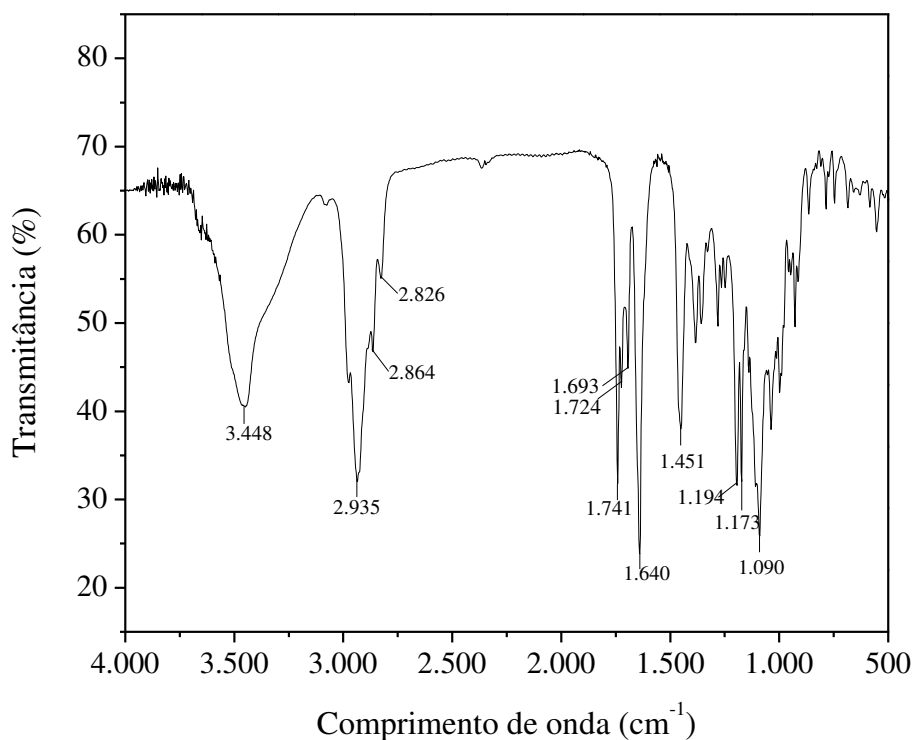


Nota-se na Figura 4.3, entretanto, que não é possível observar os 4 eventos térmicos, como reportado por Böer *et al.* (2013). Nesta Tese, nota-se que há um evento térmico na região entre 40-190 °C, e corresponde à perda de massa de 1,9 %, que é característica do tacrolimo monohidratado. O segundo evento térmico evidenciado situa-se entre 193-299 °C, que representa uma perda de massa na ordem de 20 %. O último evento presente no padrão utilizado para a DTG da Figura 4.3 apresentou um evento entre 303-550 °C com uma perda de massa ao redor de 74 %. Os eventos descritos em Böer *et al.* (2013) situam-se entre 25-200 °C, 200-285 °C, 285-470 °C e 470-700 °C. O último evento relatado pelo autor não pode ser percebido nesta Tese.

### 4.1.2 Espectro de FT-IR

A Tabela 2.1 expôs alguns comprimentos de ondas para bandas características de grupos funcionais presentes na estrutura química do tacrolimo. A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) do padrão de tacrolimo resultou no espectro apresentado pela Figura 4.4.

Figura 4.4 – Espectro de FT-IR do tacrolimo



É possível observar na Figura 4.4 uma banda em 3.448  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento O-H, as bandas presentes em 1.741 e 1.724  $\text{cm}^{-1}$  são características de estiramentos C=O de ésteres e cetonas, o estiramento da amida presente na estrutura do tacrolimo pode ser observada em 1.640  $\text{cm}^{-1}$ , a banda presente em 1.194  $\text{cm}^{-1}$  é referente ao estiramento C=C e em 1.173 e 1.090  $\text{cm}^{-1}$  são bandas referentes a estiramentos C-O-C de éter (TANAKA *et al.*, 1987; NAMIKI *et al.*, 1993; YAMASHITA *et al.*, 2003).

## 4.2 AVALIAÇÃO DA FASE MÓVEL E IDENTIFICAÇÃO DOS TAUTÔMEROS DO PADRÃO DE TACROLIMO

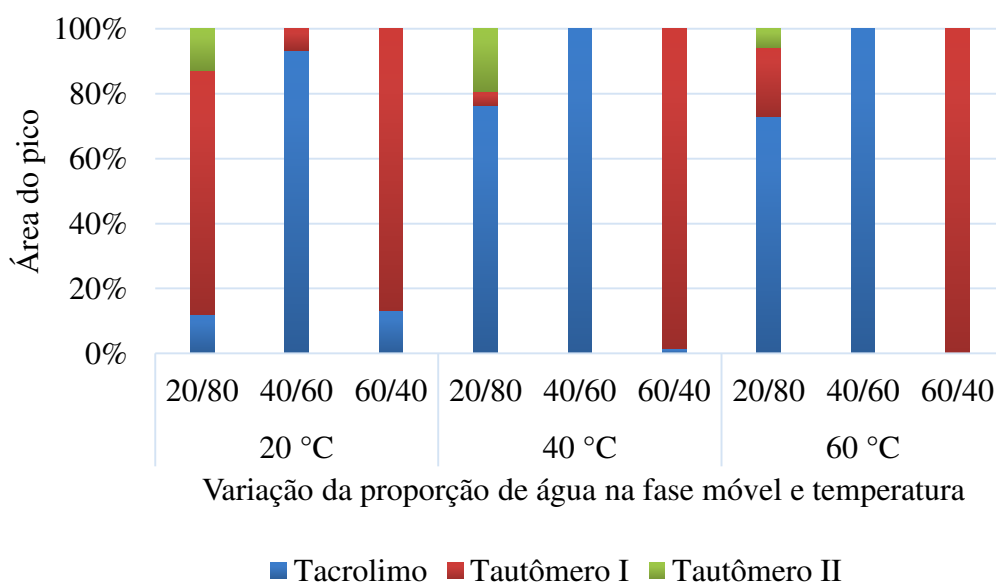
Como anteriormente descrito, na Tabela 2.5, é possível encontrar diversos métodos de quantificação do tacrolimo, em geral, utiliza-se um solvente orgânico e água como fase móvel, e a temperatura de trabalho varia entre 50-60 °C (CVAK *et al.*, 2008).

A fase móvel eleita para esta Tese foi constituída de uma mistura binária de acetonitrila e água (SINGH e BEHERA, 2009; TURLO *et al.*, 2012). Porém, não há um consenso sobre a proporção de cada componente da fase móvel, levando a cada autor a desenvolver seu método analítico, usualmente baseado em métodos já utilizados e consolidados por mais autores. Dado essas informações, fez-se necessário um estudo mais aprofundado da proporção de água, acetonitrila e temperatura de trabalho.

A avaliação da fase móvel e temperatura deu-se pelo estudo nas proporções água e acetonitrila de 20/80, 40/60 e 60/40 (v/v), e nas temperaturas de 20, 40 e 60 °C. Em cada configuração de proporção e temperatura foram realizadas injeções de 20 µL de uma solução padrão de tacrolimo (100 mg L<sup>-1</sup>) em coluna analítica empacotada com sílica C18.

A Figura 4.5 representa as injeções do padrão do fármaco com as variações acima citadas. Com estas variações, de acordo com Akashi *et al.* (1996), torna-se possível observar, no cromatograma, os tautômeros do tacrolimo.

Figura 4.5 – Efeito da temperatura e água no equilíbrio tautomérico



A Figura 4.5 demonstra o efeito de tautomerização do tacrolimo em meio aquoso. Percebe-se que, a fase móvel composta de 20/80 água e acetonitrila nas temperaturas 20, 40 e 60 °C permite visualizar o tacrolimo e suas duas formas tautoméricas, variando apenas na razão de cada componente. As proporções 40/60 e 60/40 a 20 °C não apresentaram o tautômero II, apenas o tacrolimo e seu tautômero I.

A fase móvel 60/40 a 40 °C apresentou uma proporção menor que 0,5 % de tacrolimo em seu cromatograma resultante, a mesma fase móvel a 60 °C não apresentou tacrolimo em seu cromatograma, apenas o tautômeros I.

As proporções de 40/60 a 40 a 60 °C apresentaram os resultados mais aceitáveis para a quantificação do tacrolimo, pois com essa configuração pode-se perceber apenas um pico no cromatograma, referente ao tacrolimo. Entretanto, o pico cromatográfico do tacrolimo na fase móvel composta por 40 % de água e 60 % de acetonitrila a 40 °C apresenta efeito de cauda muito acentuado o que inviabiliza a sua utilização rotineiramente. Desta maneira, a fase móvel eleita para as quantificações cromatográficas nesta Tese foi a solução binária de 40 % de água e 60 % de acetonitrila e água a 60 °C, pois apresenta apenas o pico do tacrolimo sem efeito de cauda.

Notou-se que a ordem de eluição do tacrolimo é alterada com a variação de temperatura, entretanto, os tempos de retenção das impurezas iniciais do cromatograma se mantiveram inalterados, o que causa uma dificuldade em subsequente processo de purificação do fármaco, uma vez que o tempo de retenção do tacrolimo fica muito próximo ao tempo das impurezas.

Um fato importante que deve ser ressaltado é que a Figura 4.5 propiciou condições para a separação dos tautômeros do tacrolimo e, com isso, torna-se possível a avaliação termodinâmica e atividade biológica de cada um.

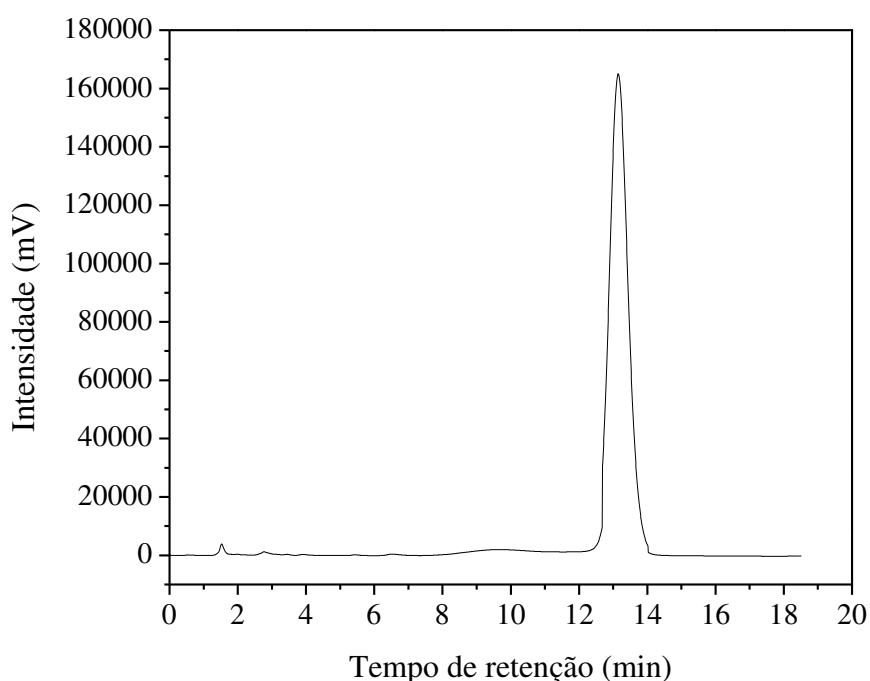
### **4.3 MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO TACROLIMO**

Fica claro que os métodos de análises térmicas e FT-IR são técnicas de alta precisão e robustez, por outro lado, não são técnicas de fácil acesso em todos os laboratórios e, ainda, possuem um alto custo envolvido, o que torna inviável a sua utilização rotineira para a caracterização do caldo fermentado, bem como a quantificação do tacrolimo produzido ao longo do processo fermentativo.

Um método analítico de grande importância na avaliação de produção de metabólitos secundários é a cromatografia líquida de alta eficiência. Neste aspecto a cromatografia possui amplo destaque, por sua capacidade de separar misturas complexas, além de prover diretamente informações quantitativas e qualitativas (MEYER, 2004).

No Capítulo 2, a Tabela 2.5 expôs um resumo de métodos analíticos aplicados à análise de quantificação de tacrolimo. O método utilizado nesta Tese foi um híbrido dos apresentados pelos autores citados na referida Tabela. De acordo com a fase móvel e temperatura definidas anteriormente, foram realizadas injeções de 20  $\mu\text{L}$  do padrão de tacrolimo com concentração de 200  $\text{mg L}^{-1}$  em coluna analítica C18 (ThermoQuest *Hyperbond* 300  $\times$  3,9 mm) em vazão constante de 1  $\text{mL min}^{-1}$  e monitoramento em comprimento de onda em 210 nm. A Figura 4.6 representa o cromatograma de uma injeção do padrão.

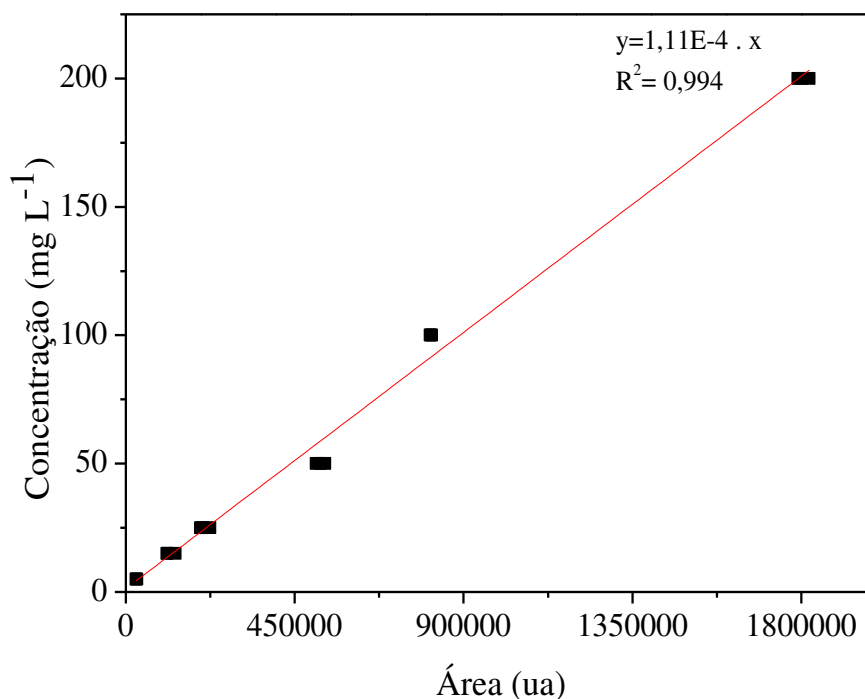
Figura 4.6 – Cromatograma do padrão de tacrolimo em coluna analítica C18



A partir dos dados de área e tempo de retenção obtidos por meio do cromatograma da Figura 4.6, assumiu-se que o pico apresentado em cada amostra coletada durante a fermentação, com o mesmo tempo de retenção do padrão da Figura 4.6, era o tacrolimo.

Porém, para a quantificação do fármaco produzido era necessária uma curva de calibração analítica. Para tal, uma solução padrão de tacrolimo foi diluída em acetonitrila e água (60:40 v/v) nas concentrações de 5, 15, 25, 50, 100 e 200 mg L<sup>-1</sup>. Cada concentração foi injetada em replicatas de 3 e os valores apresentados na Figura 4.7 representam as três injeções realizadas monitoradas em 210 nm.

Figura 4.7 – Curva de calibração do tacrolimo

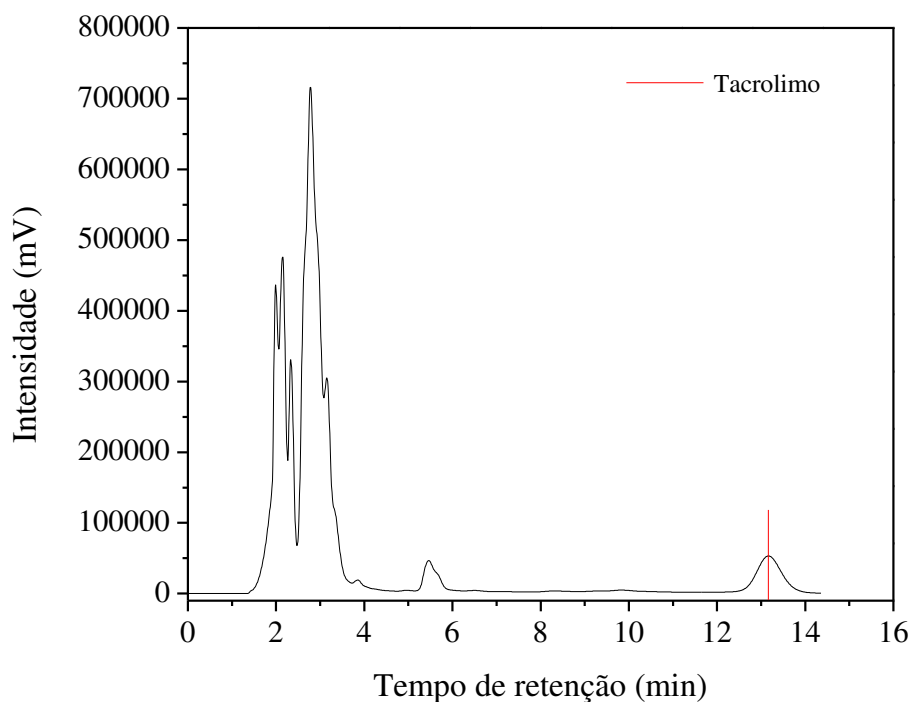


A partir dos valores apresentados na Figura 4.7 foi possível quantificar o fármaco nas amostras coletadas.

A Figura 4.8 apresenta o cromatograma de uma amostra coletada ao longo de uma fermentação por *S. tsukubaensis* para a produção do tacrolimo, tendo maltose como fonte de carbono e peptona de soja e licor íngreme de milho como fontes de nitrogênio. A amostra da Figura 4.8 representa uma alíquota coletada após 144 h de fermentação. Entretanto, como a produção do tacrolimo por biossíntese da *S. tsukubaensis* possui baixo rendimento, para que o pico do tacrolimo pudesse ser observado no cromatograma, foi utilizado o método do padrão interno, onde se aplica uma quantidade do padrão dissolvido no mesmo solvente e observa-se o aumento na área do tacrolimo

para o seu tempo de residência na coluna. Caso tal método não fosse utilizado, apenas constaria o valor da área referente à produção.

Figura 4.8 – Amostra de fermentação por *S. tsukubaensis* para a produção de tacrolimo



Percebe-se na Figura 4.8 que o processo de preparo das amostras descrito no Capítulo 3, apesar de ter proporcionado a quantificação do tacrolimo, não foi suficientemente bom para remover as impurezas geradas no decorrer da biossíntese dos metabólitos secundários. O aglomerado de picos no início do cromatograma pode ser atribuído a proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e metabólitos primários (WANG *et al.*, 2017).

As proteínas presentes no caldo fermentado podem ser removidas com adsorção utilizando carvão ativado, terra diatomácea e/ou algumas resinas como a Diaion® HP-20. Entretanto, tais resinas sozinhas não conseguem separar os compostos análogos ao tacrolimo, como a Figura 2.2 exemplifica. Para a separação dos análogos faz-se necessário a utilização de resinas com propriedades mais específicas, como a CG161M, sílica C18 e cromatografia com íons de prata, além de processos de cristalização (KINO *et al.*, 1987; KERI *et al.*, 2006; CVAK *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2013). Todavia, não

está no escopo desta Tese a purificação do tacrolimo de suas impurezas, mas apenas, a avaliação de meios e aditivos para a produção do fármaco.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DAS FONTES PRIMÁRIAS DE CARBONO E DE NITROGÊNIO

Em se tratando de meios quimicamente definidos para fermentação, ou seja, meios em que todos os componentes são solidamente conhecidos, a preocupação com o valor real da razão carbono/nitrogênio é inexistente (CORUM *et al.*, 1954). Entretanto, a maior parte dos meios são constituídos de um ou mais componentes oriundos de fontes complexas (KINO *et al.*, 1987; SINGH e BEHERA, 2008; TURLO *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2013).

Desta forma, faz-se necessário testes adicionais que possam quantificar a porcentagem de carbono e nitrogênio em fontes complexas. Os ensaios de Carbono Orgânico Total (COT) e Nitrogênio Kjeldahl (N – Kjeldahl) atendem às necessidades acima citadas. Nesta Tese, as fontes primárias de carbono foram maltose e glicose, ao passo que as fontes de nitrogênio foram peptona de soja e o licor íngreme de milho. Os ensaios realizados nas fontes de carbono e nitrogênio foram conduzidos no CQA – Centro de Qualidade Analítica, Campinas/SP. Os laudos relativos às análises encontram-se no Anexo A desta Tese. Os resultados dos ensaios laboratoriais estão expostos na Tabela 4.1. De acordo com o laudo técnico enviado pelo CQA, o limite de quantificação é de 0,01 para o ensaio de COT e 0,2 para nitrogênio Kjeldahl.

Tabela 4.1 – Resultados de análise de COT e nitrogênio Kjeldahl em peptona de soja e licor íngreme de milho

| Amostras               | Ensaio       |                 |
|------------------------|--------------|-----------------|
|                        | COT          | N - Kjeldahl    |
|                        | % de carbono | % de nitrogênio |
| Peptona de soja        | 44,4         | 9,89            |
| Licor íngreme de milho | 12,5         | 1,6             |

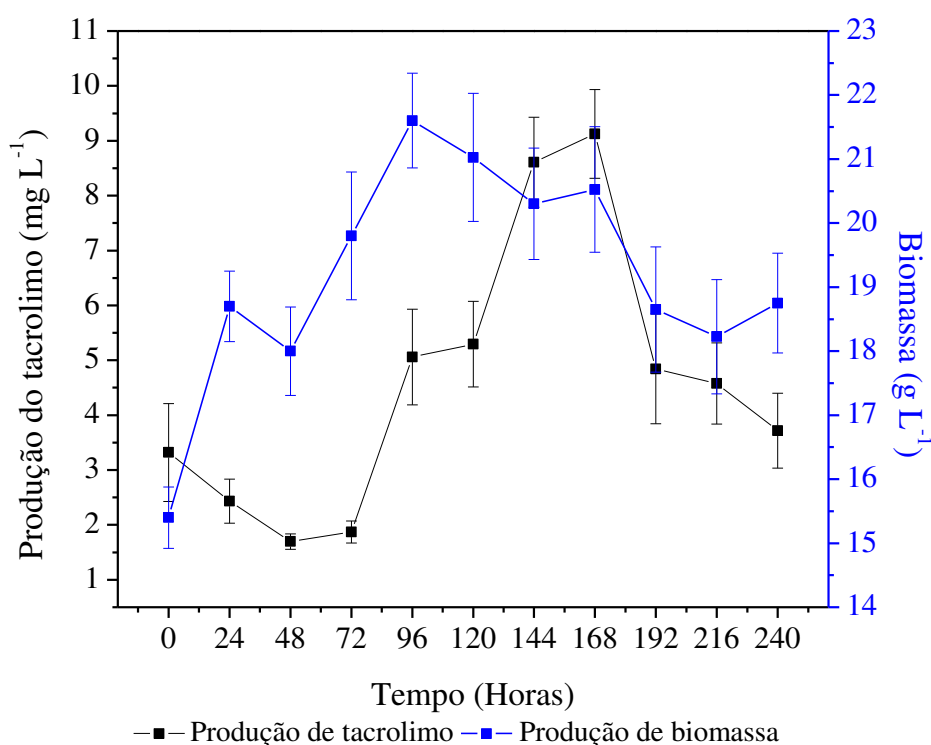
## 4.5 FERMENTAÇÕES PRELIMINARES

### 4.5.1 Fermentação com maltose a 30 °C e duração de 10 dias

Os resultados a partir deste tópico da Tese estão agrupados em ordem cronológica, além de apresentados em blocos divididos em meios de cultivo.

Baseando-se nos meios e parâmetros descritos no Capítulo 3, Tabela 3.5, foi iniciada a primeira fermentação por *S. tsukubaensis* com o intuito de produzir o tacrolimo. A fonte primária de carbono foi a maltose (2%) e, como fonte de nitrogênio a peptona de soja (3%). A fermentação foi conduzida a 30 °C, 110 rpm por 10 dias (TURLO *et al.*, 2012). A Figura 4.9 representa a dinâmica de produção do tacrolimo e biomassa.

Figura 4.9 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL a 30 °C por 10 dias



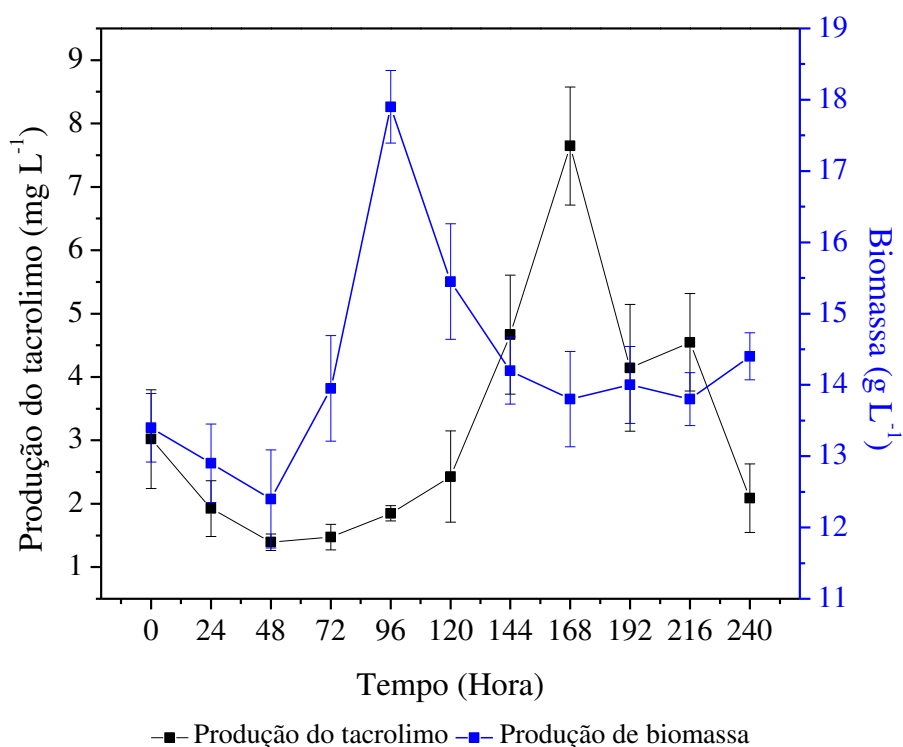
O meio utilizado na Figura 4.9 foi o mesmo descrito em Turlo *et al.* (2012), entretanto, a produção de tacrolimo nesta Tese foi superior ao descrito pelos autores. Nesta Tese a produção máxima com o meio MPL situa-se ao redor de 9 mg L<sup>-1</sup> e, a produção relatada pelos autores ficou entre 5-6 mg L<sup>-1</sup>, porém, a produção de biomassa relatada no trabalho dos autores está entre 3-5 g L<sup>-1</sup>, muito inferior a biomassa apresentada na Figura 4.9, o que faz com que a produção específica dos autores seja

maior que a obtida na Figura 4.9. Tal variação pode ser explicada devido aos componentes do meio, como a Tabela 4.1 apresentou, fontes complexas de nitrogênio e carbono possuem distinções em suas composições.

A biossíntese máxima do tacrolimo no meio MPL sem suplementação descrito nesta Tese deu-se em 168 horas, o que está de acordo com o encontrado na Literatura, situando-se entre 120 e 168 horas, variando de acordo com os meios utilizados (SINGH e BEHERA, 2008; TURLO *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

Além do meio MPL sem suplementação, foi realizada uma fermentação nas mesmas condições, porém com a adição de L-lisina, que é citada como um aditivo à biossíntese do tacrolimo (SINGH e BEHERA, 2009). A porcentagem utilizada baseou-se em Singh e Behera (2009), que suplementaram o meio com 0,1 % de L-lisina. O resultado em termos de produção de tacrolimo e biomassa estão expostos na Figura 4.10.

Figura 4.10 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL e 0,1 % de L-lisina a 30°C por 10 dias

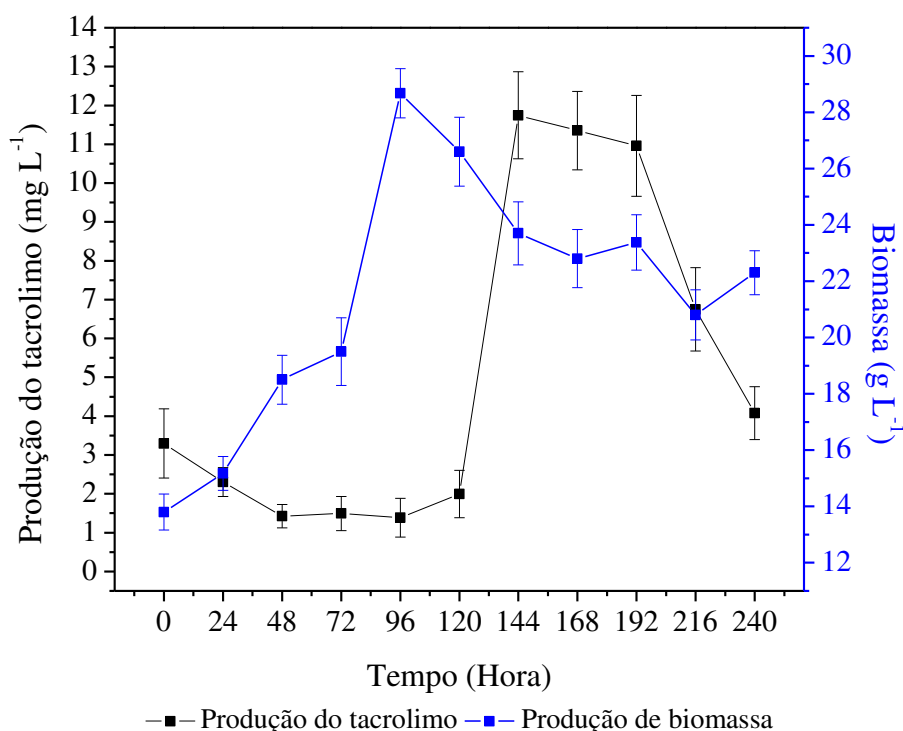


A Figura 4.10 se comparada à Figura 4.9 mostra uma tendência muito similar. Ambas possuem a produção máxima de biomassa em 96 horas. Porém, o valor máximo

da biomassa com L-lisina foi de  $17,9 \text{ g L}^{-1}$ , o que representa redução de 17,45 % com relação à produção como meio não suplementado. A biossíntese máxima do tacrolimo deu-se em 168 horas para ambos os casos, entretanto, a L-lisina suprimiu a produção do tacrolimo em 19,34 % quando comparado a produção do meio sem a adição da L-lisina, tal efeito não pode ser observado no trabalho de Singh e Behera (2009), onde a L-lisina quando suplementada ao meio, incrementou em mais de 20 % a produção do fármaco. Entretanto, deve-se ressaltar que a cepa utilizada foi desenvolvida no laboratório dos autores, a *Streptomyces* spp. MA6858 B3178, a diferença entre as cepas produtoras pode ter sido o fator preponderante para tal variação em produção, sugerindo rotas de metabolismos diferentes entre as cepas produtoras do tacrolimo.

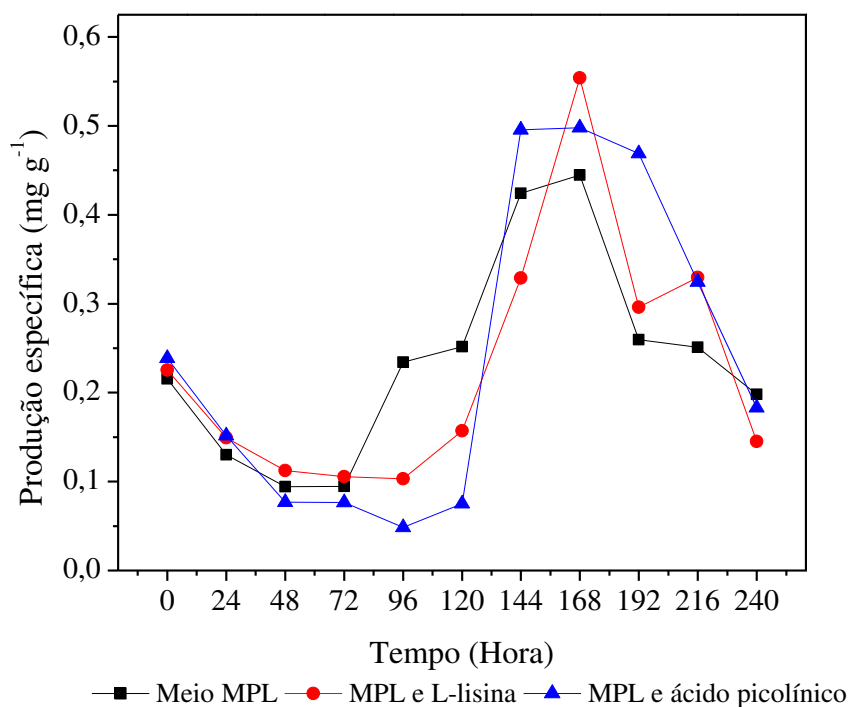
Turlo *et al.*, 2012, propuseram o uso de compostos como ácido picolínico, ácido nicotínico e nicotinamida como possíveis precursores do tacrolimo. Os autores realizaram fermentações com meios suplementados e não suplementados com os compostos citados. Baseado na proporção de melhor resultado apresentada pelos autores, decidiu-se utilizar 0,0025 % de ácido picolínico suplementando o meio MPL. A dinâmica de produção do tacrolimo e de biomassa está exposta na Figura 4.11

Figura 4.11 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL e 0,0025 % de ácido picolínico a 30°C por 10 dias



Percebe-se na Figura 4.11 que o ácido picolínico fez com que a biossíntese máxima do tacrolimo tivesse uma redução de 24 horas, se comparado com os casos anteriormente citados. Nominalmente, o meio MPL com ácido picolínico apresentou a maior produção, ao redor de  $12 \text{ mg L}^{-1}$ . Porém, também apresentou maior acúmulo de biomassa, 36,41 % que o meio sem suplementação e 60,22 % maior que o meio suplementado com a L-lisina. A produção de biomassa, afeta diretamente a produção específica, que é dada pela razão entre a produção do fármaco e a produção da biomassa. A produção específica do tacrolimo, para os 3 casos anteriormente apresentados está exposto na Figura 4.12.

Figura 4.12 – Produção específica do tacrolimo via fermentação por *S. tsukubaensis* em meio MPL a 30 °C



Nota-se que em todos os casos apresentados na Figura 4.12 o valor inicial de produção específica é muito similar. A razão pela qual no tempo 0 o valor de tacrolimo presente no caldo não ser nulo, dá-se pelo fato de que cada *erlenmeyer* é inoculado com 10 % de inóculo proveniente de uma cultura já crescida.

Ainda pode se perceber que o meio suplementado com L-lisina apresentou o melhor valor de produção específica, ficando ao redor de 0,55 miligrama de tacrolimo por cada grama de biomassa produzida.

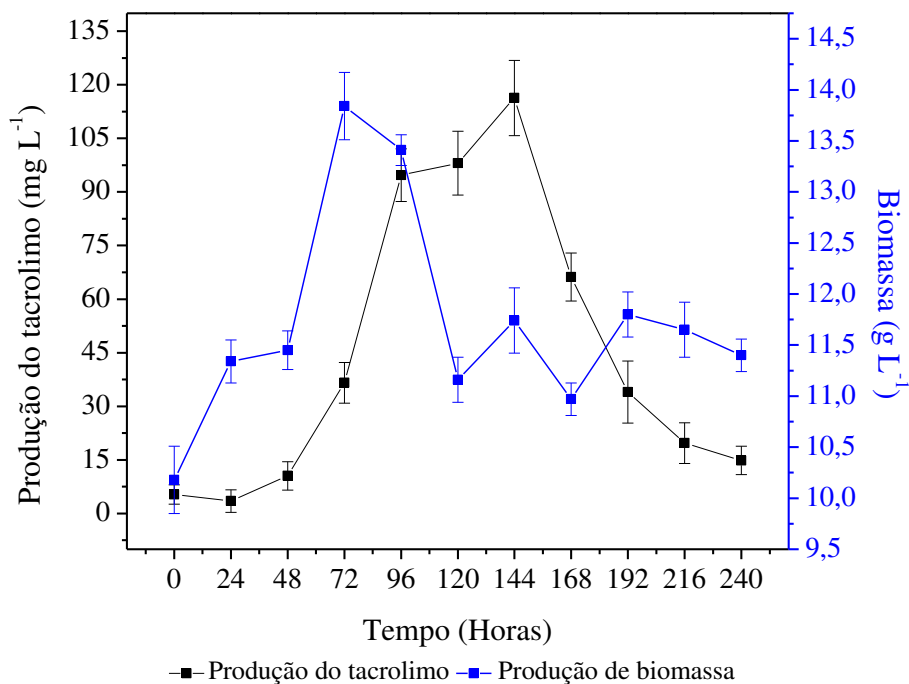
Os meios MPL e os parâmetros de temperatura, agitação e pH não foram bons o suficiente para atingir uma produção específica próxima ao relatado na literatura para a *S. tsukubaensis*, entre 2-17 mg g<sup>-1</sup>. Pode-se perceber que os parâmetros claramente foram em auxílio ao crescimento das bactérias em detrimento a produção de tacrolimo (TURLO *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

#### 4.5.2 Fermentação com maltose a 28 °C e duração de 10 dias

Após os resultados apresentados na Figura 4.12, optou-se pela alteração da temperatura de fermentação, reduzindo de 30 °C para 28 °C e a alteração de 110 para 130 rpm, com o intuito de avaliar se a temperatura seria um fator limitante para a biossíntese do tacrolimo ou crescimento celular (XIA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017). Com exceção à temperatura, todos os demais mantiveram-se como descritos na Tabela 3.5.

A Figura 4.13 representa os dados obtidos na fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL a 28 °C e com duração total de 10 dias.

Figura 4.13 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL a 28 °C por 10 dias

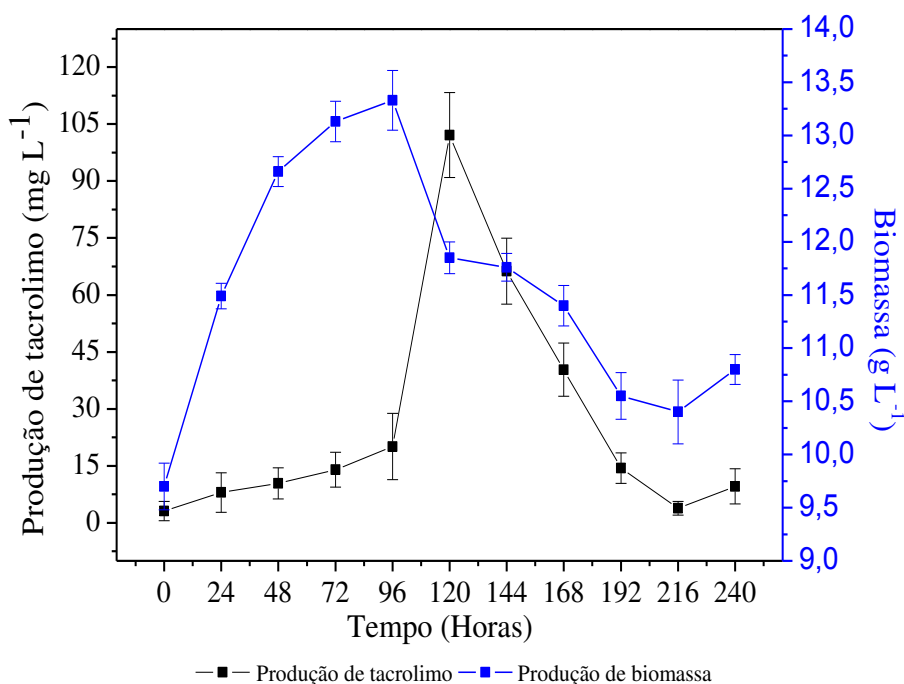


Com a redução de 2 °C na temperatura do processo fermentativo e o aumento na agitação de 110 para 130 rpm, ocorreu um incremento acentuado no processo de biossíntese do tacrolimo, e ainda, houve uma redução na produção de células, tal feito leva a uma produção específica mais elevada. Se comparar os valores obtidos a 28 °C com os apresentados a 30 °C, a produção máxima de tacrolimo a 28 °C deu-se em 144 horas, 116,30 mg L<sup>-1</sup>, este valor é 12,74 vezes maior que a produção máxima a 30 °C, alcançada em 168 horas. Comparando os valores de tacrolimo a 168 horas para ambos os casos, a redução de 30 para 28 °C acarretou aumento de 7,23 vezes.

Os autores Wang *et al.* (2017) alcançaram 106,42 mg L<sup>-1</sup> como produção máxima de tacrolimo utilizando a cepa *S. tsukubaensis*, dextrana e glicose como fontes de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Os parâmetros de processo dos autores diferem dos utilizados nesta Tese, uma vez que a velocidade de agitação foi de 200 rpm, 28 °C como temperatura de fermentação e pH inicial de 6,5.

Assim como nas fermentações a 30 °C houve a suplementação do meio com L-lisina e ácido picolínico, o mesmo deu-se a 28 °C. A porcentagem de L-lisina suplementada ao meio MPL foi o mesmo, ou seja, 0,1 %. A Figura 4.14 apresenta o comportamento da fermentação com o meio anteriormente citado.

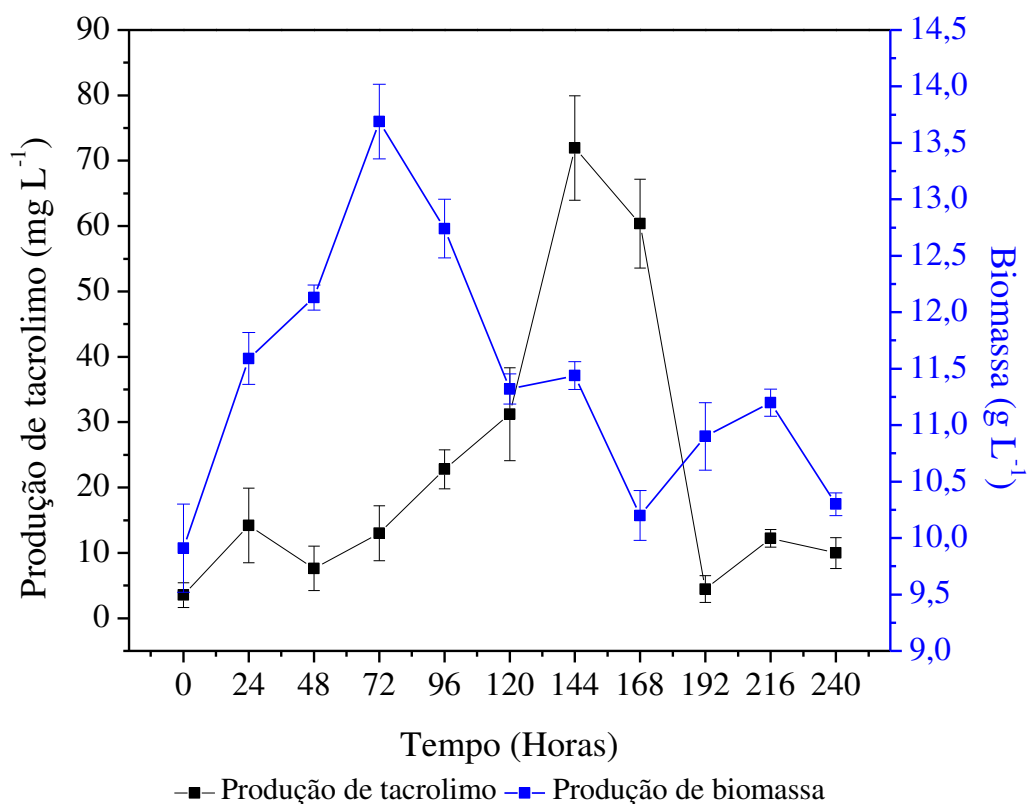
Figura 4.14 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL e 0,1 % de L-lisina a 28 °C por 10 dias



A tendência de crescimento bacteriológico e de produção de tacrolimo expostos na Figura 4.14 difere do apresentado Figura 4.13, uma vez que a produção do tacrolimo deu-se em 144h com o meio não suplementado e em 120h com o meio suplementado com 0,1 % de L-lisina. Ambos os meios apresentaram a mesma ordem de grandeza na produção do tacrolimo, 116,30 mg L<sup>-1</sup> para o meio MPL e 102,09 mg L<sup>-1</sup> para o meio MPL suplementado com L-lisina. Percebe-se que a L-lisina levou a uma redução em 13,91 % na produção máxima do tacrolimo e acréscimo de 1 % na produção de biomassa.

O ácido picolínico é formado por um anel heterocíclico de seis membros contendo um heteroátomo de nitrogênio, assim como apresentado na estrutura do tacrolimo, por esta razão Turlo *et al.*, 2012 o estudaram como precursor ao fármaco. A Figura 4.15 apresenta o meio MPL acrescido de 0,0025 % de ácido picolínico e a fermentação conduzida a 28 °C.

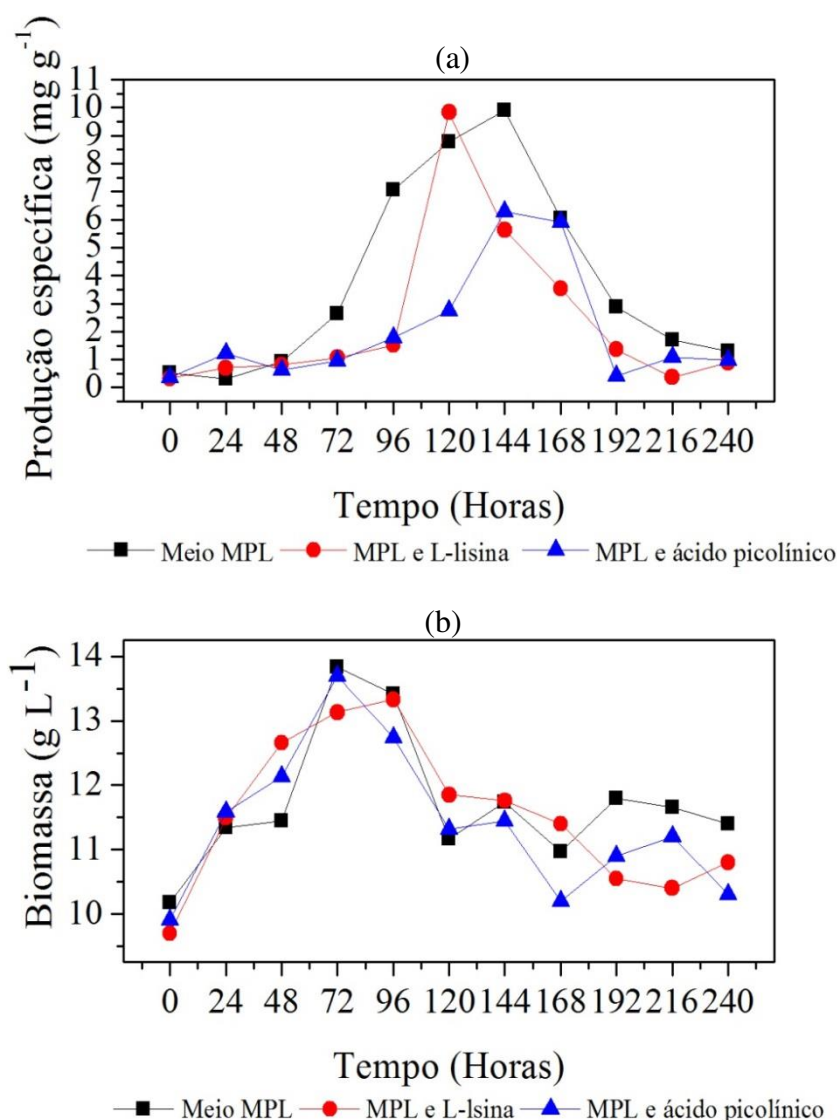
Figura 4.15 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL e 0,0025 % de ácido picolínico a 28 °C por 10 dias



Nota-se que dentre as fermentações conduzidas a 28 °C o meio suplementado com o ácido picolínico foi o qual apresentou a menor produção, 71,93 mg L<sup>-1</sup>. Os autores Turlo *et al.*, 2012 obtiveram produção, com meio contendo ácido picolínico, 2,7 vezes menor que o relatado nesta Tese, porém, os autores conduziram a fermentação a 30 °C.

Com os valores de produção e biomassa torna-se possível traçar a dinâmica da produção específica para o meio MPL a 28 °C, como exposto na Figura 4.16.

Figura 4.16 – Produção específica do tacrolimo via fermentação por *S. tsukubaensis* em meio MPL a 28 °C (a) e produção de biomassa (b)



Assim como ocorreu com os resultados apresentados na Figura 4.12, percebe-se que o valor inicial de produção específica para os três casos é muito parecido, isso se dá

devido, como anteriormente explanado, a inoculação ser a partir de um meio com células crescidas e em fase de produção do tacrolimo.

A variação da temperatura e agitação agiram de forma benéfica para a biossíntese do fármaco, ou seja, atenuou a produção de células e acentuou a produção do fármaco. O incremento na produção específica foi observado em todos os casos aqui estudados, o aumento foi de 22,3 vezes para o caso de meio sem suplementação alguma, 15,54 vezes maior no caso do meio MPL acrescido de L-lisina, e 12,58 vezes maior no caso do meio com ácido picolínico.

Níveis de produção específica encontrados na Literatura para fermentações conduzidas a 28 °C e com a bactéria *S. tsukubaensis*, ficam entre 3,2 e 16 mg g<sup>-1</sup>, o que revela que os valores encontrados nesta Tese, ao redor de 10 mg g<sup>-1</sup>, estão em conformidade com os valores descritos na Literatura (TURLO *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-CASTRO *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

#### **4.6 FERMENTAÇÃO COM MALTOSE E VARIAÇÃO NA RAZÃO C:N CONDUZIDA POR 7 DIAS.**

Os resultados aqui apresentados foram de fermentações conduzidas com variações na razão carbono/nitrogênio. Esta variação foi realizada para avaliar a causa e efeito de um meio com maior suplementação de carbono. As razões nesta etapa da Tese foram: 2,0:1,0 e 3,0:1,0, além da realização de uma fermentação com razão 3,0:1,0, porém, sem o uso do licor íngreme de milho como fonte de nitrogênio.

Como descrito no Capítulo 3, faz-se necessário conhecer melhor as fontes de carbono e/ou nitrogênio provenientes de origem complexa. A Tabela 4.1 apresentou a composição percentual de carbono orgânico total e nitrogênio Kjeldahl. De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.1, pode-se construir a Tabela 4.2, que apresenta as razões de C:N estudadas. As razões nominais são as quais não levam em consideração os dados da Tabela 4.1, mas apenas as porcentagens das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas na composição do meio de fermentação, ao passo que a razão real considera as porcentagens de carbono e nitrogênio reais em cada componente.

Tabela 4.2 – Razões carbono/nitrogênio nominais e reais para fermentação conduzida por 10 dias

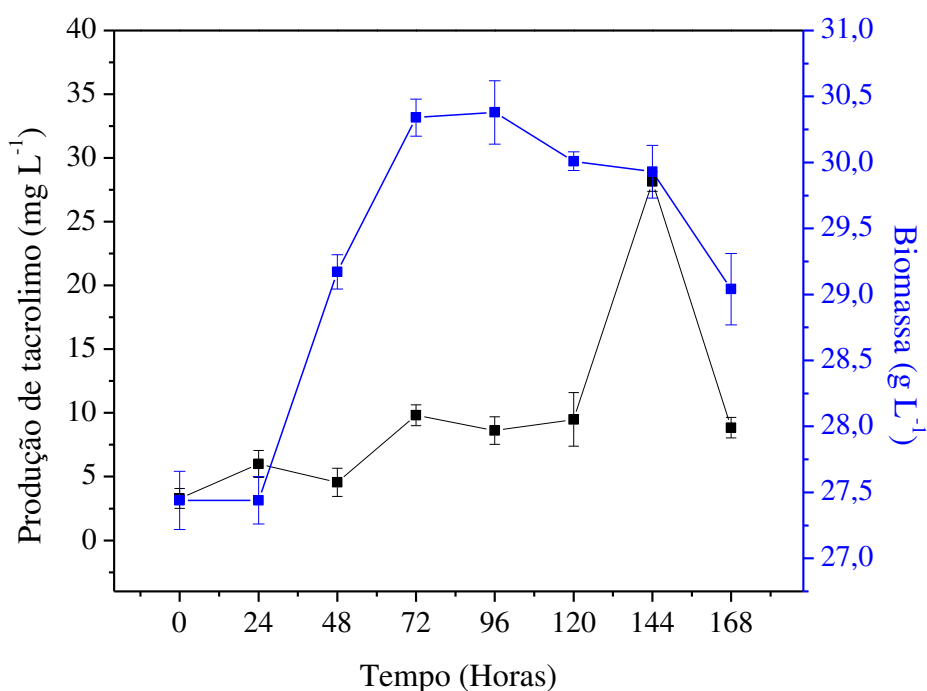
| Razão nominal | Razão real |
|---------------|------------|
| 2,0:1,0       | 30:1,0     |
| 3,0:1,0       | 43:1,0     |
| 3,0:1,0*      | 35:1,0     |

\* razão carbono/nitrogênio sem o uso do licor íngreme de milho

Os dados apresentados na Figura 4.16 apontaram que a produção máxima do tacrolimo ocorreu entre 120 e 144 horas, portanto, optou-se por conduzir as fermentações deste Item por 7 dias. Os demais parâmetros do processo fermentativo foram mantidos: temperatura de 28 °C, 130 rpm de agitação e 7,2 como pH inicial do meio de produção. O meio utilizado foi o MPL, com as variações nas razões C:N anteriormente descritas.

A Figura 4.17 apresenta os resultados obtidos com o meio MPL e razão carbono/nitrogênio de 2,0:1,0.

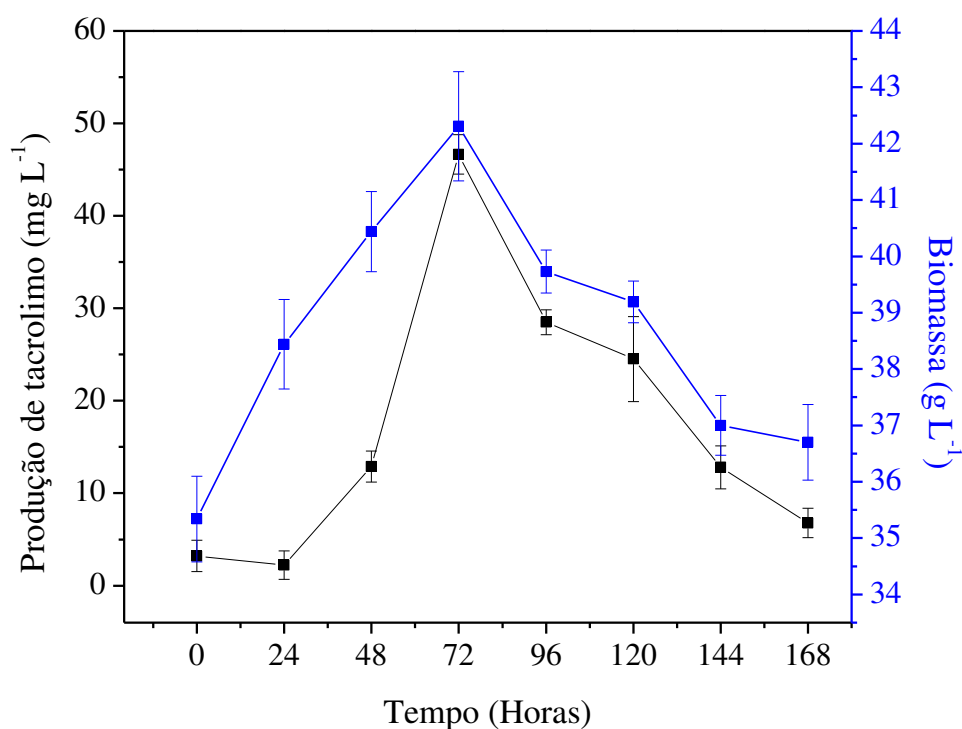
Figura 4.17 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL e razão C:N nominal de 2,0:1,0



A produção máxima do tacrolimo deu-se após 144 horas de fermentação, e apresentou valor máximo de  $28,15 \text{ mg L}^{-1}$ , valor baixo quando comparado a resultados já apresentados nesta Tese. Entretanto, quando se compara com os valores obtidos nas fermentações conduzidas a  $30^\circ\text{C}$ , observa-se que o valor exposto na Figura 4.17 é superior em mais de 3 vezes aos resultados obtidos com o meio MPL, e em mais de 2 vezes ao meio MPL suplementado com ácido picolínico. Observa-se que a produção de células máxima foi de  $30,4 \text{ g L}^{-1}$ . Contudo, notou-se que havia maltose residual no papel filtro, mesmo após o mesmo ser lavado três vezes com um volume de, no mínimo 100 mL de água destilada por vez. Este fator leva a um resultado errôneo de produção de células, desta maneira, a curva de crescimento bacteriológico serve apenas como ilustração de uma tendência e efeitos de comparação entre as fermentações aqui apresentadas.

Foi realizada uma fermentação com o meio MPL e razão nominal de carbono/nitrogênio na proporção 3,0:1,0. A Figura 4.18 apresenta graficamente os resultados desta fermentação.

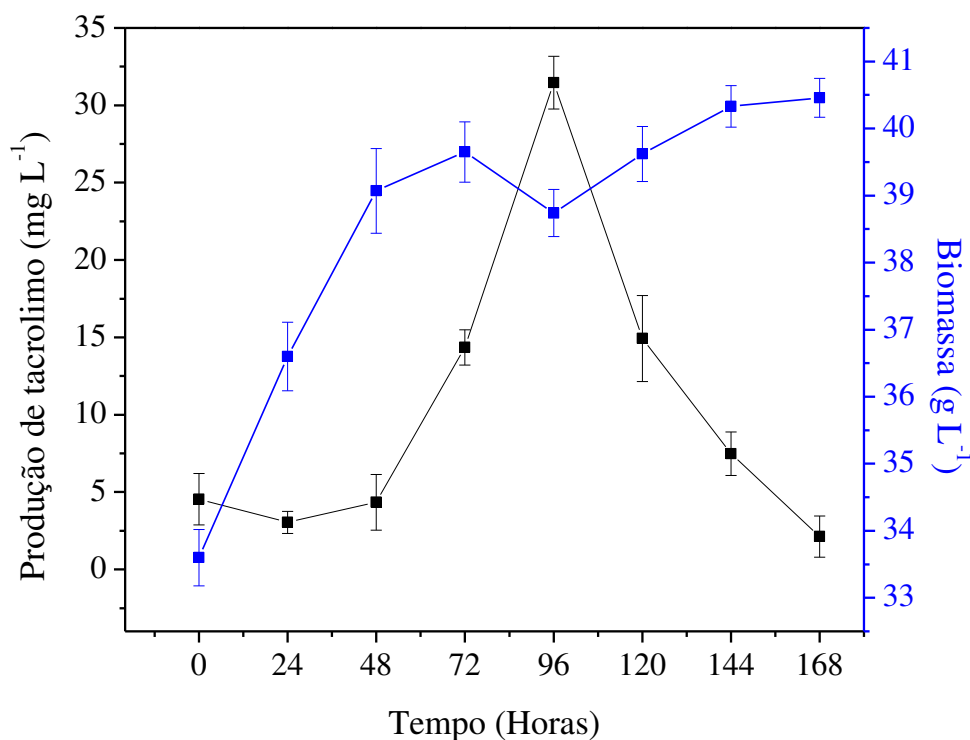
Figura 4.18 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL e razão C:N nominal de 3,0:1,0



Quando comparadas as Figuras 4.17 e 4.18, nota-se claramente o aumento significativo na produção. O incremento na produção nominal foi de 1,65 vez, saindo de 28,15 mg L<sup>-1</sup> para 46,64 mg L<sup>-1</sup>. Outro fator relevante é o tempo necessário para a produção máxima do fármaco, que ocorreu no terceiro dia, ao passo que com a razão 2,0:1,0 foi no sexto dia. Os resultados da Figura 4.18 mostraram que o aumento na proporção de carbono no meio fermentativo, acarretou em uma elevação na produção do tacrolimo, contudo, a produção máxima em massa de tacrolimo é menor do que as anteriormente relatadas.

Com o intuito de avaliar o efeito do licor íngreme de milho no processo fermentativo, foi realizada uma fermentação com a razão 3,0:1,0, porém, sem o acréscimo do licor. Os resultados estão representados na Figura 4.19.

Figura 4.19 – Fermentação por *S. tsukubaensis* com meio MPL e razão C:N nominal de 3,0:1,0 sem a adição de licor íngreme de milho



A produção nominal máxima de tacrolimo ficou na ordem de 31,47 mg L<sup>-1</sup>, o que representa uma redução de 48% se comparado com o meio composto por peptona de soja e licor íngreme de milho como fontes de nitrogênio. Outro fator importante que

o não uso do licor íngreme de milho apresentou foi o tempo para a produção máxima do tacrolimo; alterado de 72 horas para 96 horas. Apesar de o valor da biomassa não corresponder com exatidão à realidade, nota-se que o excesso de maltose leva a uma produção excessiva de biomassa, mas não necessariamente a uma maior biossíntese do tacrolimo pelas células.

#### 4.7 FERMENTAÇÕES COM MEIO GPL E VARIAÇÕES NA RAZÃO CARBONO/NITROGÊNIO.

Após os resultados apresentados nos itens 4.5.2 e 4.6, percebeu-se que razões carbono/nitrogênio baixas favorecem a biossíntese do tacrolimo pela bactéria estudada nesta Tese, *S. tsukubaensis*. A maltose, como fonte primária de carbono, mostrou ser capaz de favorecer a produção do tacrolimo. Além do efeito da temperatura nos resultados das fermentações, optou-se por estudar os efeitos da glicose como fonte de carbono alternativa à maltose (KINO *et al.*, 1987a; MARTÍNEZ-CASTRO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

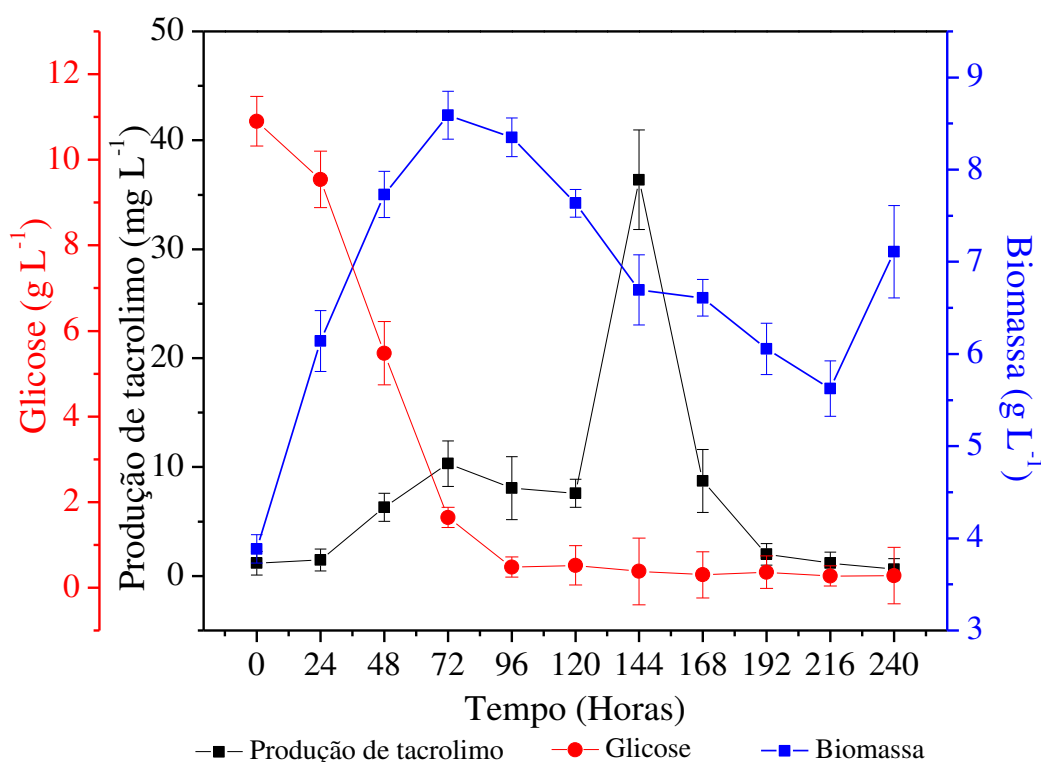
Para avaliar o efeito da glicose na dinâmica de produção de biomassa e tacrolimo foram realizadas fermentações com variações na razão carbono/nitrogênio. A porcentagem das fontes de nitrogênio foram mantidas as mesmas das fermentações anteriores, ou seja, 3 % de peptona de soja e 1 % de licor íngreme de milho. As razões carbono/nitrogênio utilizadas foram 0,25:1,0, 0,50:1,0, 0,75:1,0 e 1,0:1,0, entretanto, tais razões não levam em consideração a composição complexa das fontes de nitrogênio. A Tabela 4.3 apresenta as razões carbono/nitrogênio nominais e reais do meio GPL.

Tabela 4.3 – Razões carbono/nitrogênio nominais e reais

| Razão nominal | Razão real |
|---------------|------------|
| 0,25:1,0      | 7,82:1,0   |
| 0,50:1,0      | 11,05:1,0  |
| 0,75:1,0      | 14,25:1,0  |
| 1,0:1,0       | 17,45:1,0  |

As fermentações com o meio GPL foram realizadas a 28 °C e conduzidas pelo período de 10 dias, para ter efeito de comparação da tendência com as fermentações apresentadas no item 4.5.2. As coletas de amostras foram mantidas periodicamente a cada 24 horas. As análises de produção de tacrolimo e biomassa se deram da mesma forma que as anteriormente citadas, apenas houve o acréscimo da análise de consumo da glicose do meio no decorrer do processo fermentativo. A Figura 4.20 apresenta os dados de produção de tacrolimo, biomassa e consumo de glicose para o meio GPL com razão C:N nominal de 0,25:1,0.

4.20 – Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,25:1,0

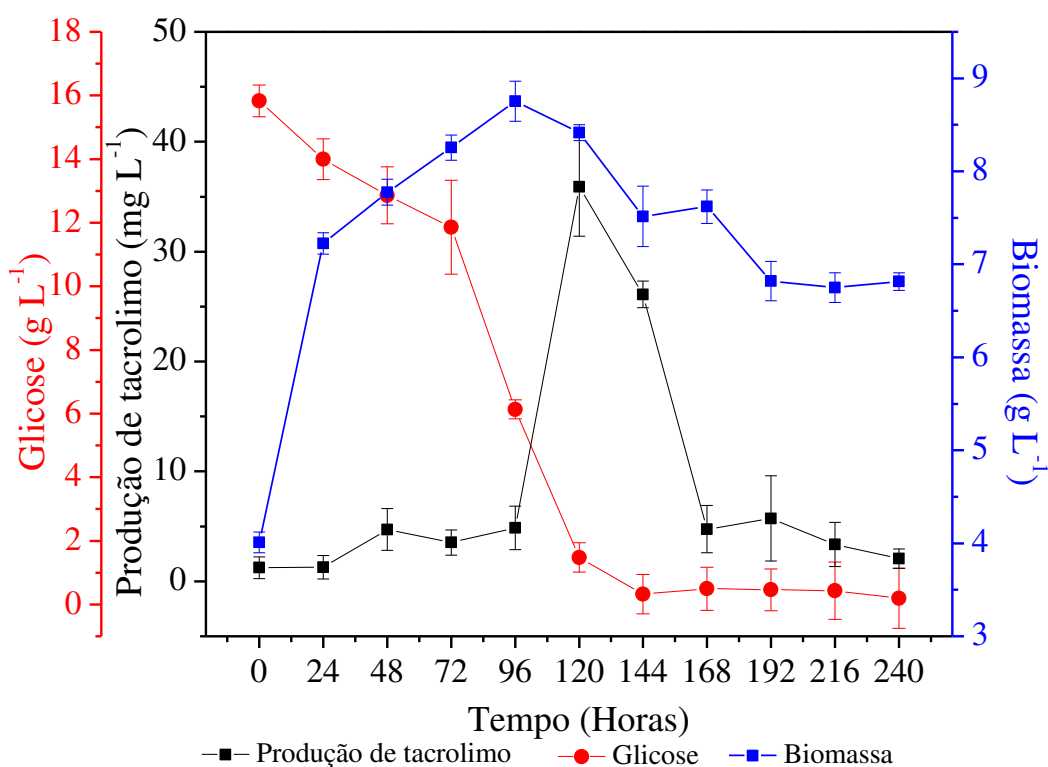


A Figura 4.20 apresenta a biossíntese máxima do tacrolimo em 144 horas, assim como ocorreu com o meio MPL sem suplementação de L-lisina e ácido picolínico. Entretanto, a produção ficou ao redor de 36 mg L<sup>-1</sup>, muito abaixo do valor encontrado com a maltose como fonte primária de carbono, 116 mg L<sup>-1</sup>. Porém, quando o valor de tacrolimo e biomassa são comparados com valores relatados na Literatura com meios utilizando glicose e *S. tsukubaensis*, os resultados aqui apresentados estão em conformidade. Martínez-Castro *et al.* (2013) e Wang *et al.* (2017) apresentaram uma

produção média entre 18-55 mg L<sup>-1</sup> com biomassa máxima na ordem de 7-9 g L<sup>-1</sup>. Os autores não relataram a razão carbono/nitrogênio real, porém, a razão nominal fica em 3,54:1,0 para os autores Martínez-Castro *et al.* (2013) e, para os autores Wang *et al* (2017) a razão foi de 20:1,0.

Os resultados apresentados na Figura 4.21 representam uma razão carbono/nitrogênio nominal de 0,5:1,0, que é a mesma razão utilizada na Figura 4.13 onde apresenta-se os resultados obtidos com maltose como fonte primária de carbono.

Figura 4.21 – Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,50:1,0

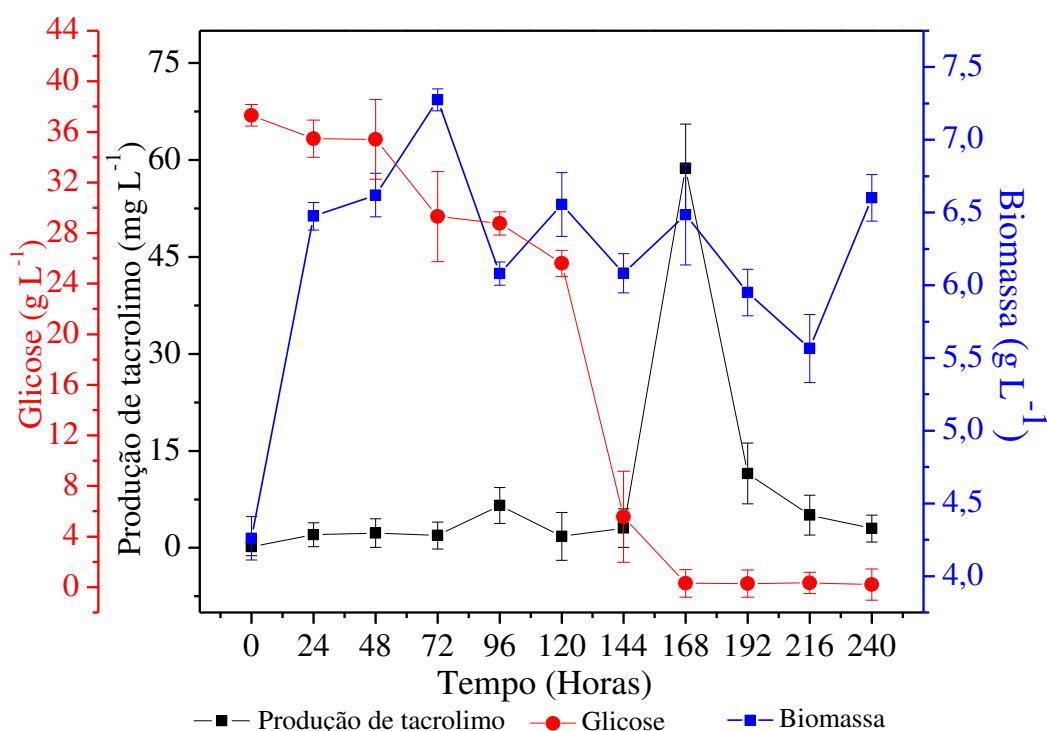


Traçando um paralelo com a Figura 4.13, houve redução em 2,31 vezes a produção específica do tacrolimo, entretanto, a produção máxima na Figura 4.21 ocorreu em 120 horas, ao passo que na Figura 4.13 a biossíntese máxima foi registrada em 144 horas após o início do processo fermentativo. Quando comparado a produção específica para ambos os casos em 144 horas, a redução fica na ordem de 2,85 vezes. Os valores nominais de produção de tacrolimo para as Figuras 4.20 e 4.21 foram os mesmos, 36 mg L<sup>-1</sup>, a diferença se deu na dinâmica de consumo da glicose e biossíntese

de tacrolimo. A variação de 0,25:1,0 para 0,5:1,0 acarretou em atraso de 24 horas na máxima biossíntese do fármaco.

A Figura 4.22 apresenta os resultados de consumo de glicose, biossíntese de tacrolimo e produção de biomassa, para uma razão carbono/nitrogênio nominal de 0,75:1,0 e razão real de 14,25:1,0.

Figura 4.22 – Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,75:1,0



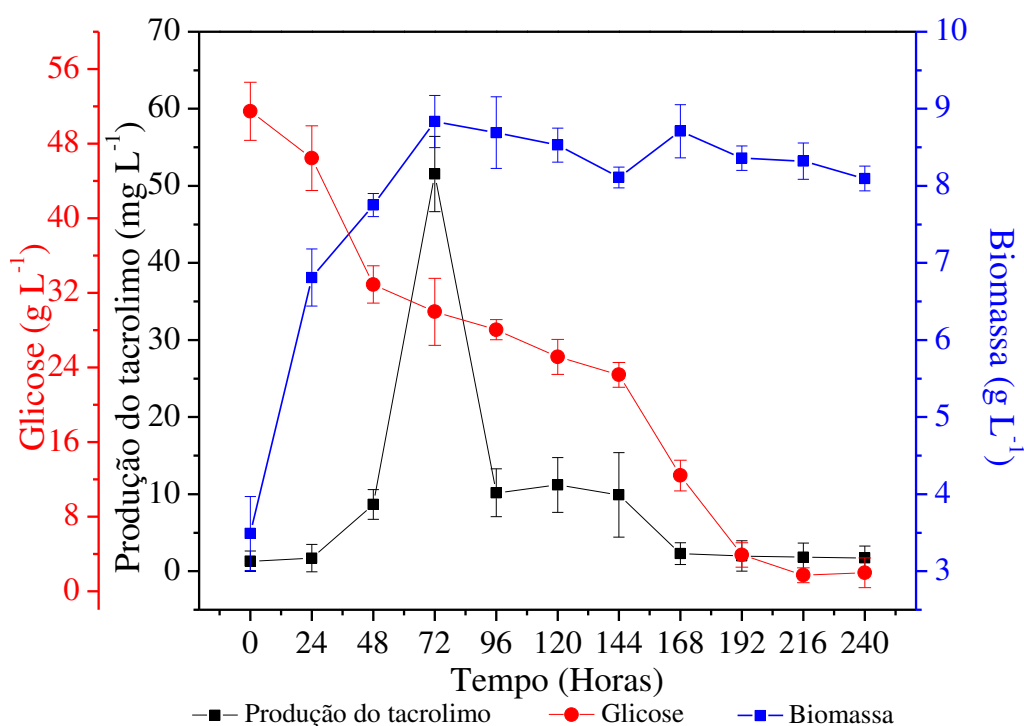
A razão apresentada na Figura 4.22 resultou em uma produção máxima de biomassa em 72 horas e tacrolimo em 168 horas. Os resultados expostos nas Figuras 4.20 e 4.21 apresentaram a tendência de crescimento celular, consumo de glicose e produção de tacrolimo parecidas. Entretanto, a produção máxima do tacrolimo deu-se em 144 horas para a razão carbono/nitrogênio 0,25:1,0 e, para a razão 0,5:1,0, após 120 horas de fermentação. Ainda, pode-se ressaltar que a produção máxima de células foi observada em 72 horas, com exceção a Figura 4.21 que teve o crescimento máximo registrado em 96 horas.

Os autores Wang *et al* (2017) utilizaram glicose na formulação do meio de fermentação, a razão carbono/nitrogênio foi de 30:1,0. O valor máximo de produção de tacrolimo alcançada pelos autores ficou em 56,35 mg L<sup>-1</sup> e, a produção de células em

6,5 g L<sup>-1</sup>, o que acarreta em uma produção específica de 8,7 mg g<sup>-1</sup>. A produção específica apresentada na Figura 4.22 é de 9,06 mg g<sup>-1</sup>, este valor aponta que razões carbono/nitrogênio menores favorecem a biossíntese do tacrolimo.

Para avaliar a tendência de produção com razão carbono/nitrogênio diferentes, decidiu-se por conduzir fermentações com razão C:N nominal de 1,0:1,0. A Figura 4.23 apresenta a compilação dos resultados destas fermentações.

Figura 4.23 – Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal 1,0:1,0



A Figura 4.23 demonstra que a razão C:N utilizada propiciou a máxima produção de tacrolimo com o menor tempo de fermentação, quando comparado as demais razões estudadas. Os autores Singh e Behera (2009) com um meio utilizando a razão C:N de 2,12:1,0, e a bactéria *Streptomyces* spp MA6858 B3178 reportaram produção máxima de tacrolimo na ordem de 82,5 mg L<sup>-1</sup>. O resultado dos autores aponta que a glicose é uma fonte de carbono viável para diversas *Streptomyces*, uma vez que os autores Mishra e Verma (2012) utilizaram a glicose como fonte principal de carbono e a bactéria foi a *Streptomyces* sp.

A Tabela 4.4 apresenta os valores de produção específica para cada razão carbono/nitrogênio estudadas.

Tabela 4.4 – Produção específica do tacrolimo em relação às razões carbono/nitrogênio avaliadas

| Razão C/N nominal | Produção específica (mg g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|-------------------------------------------|
| 0,25:1,0          | 5,43                                      |
| 0,50:1,0          | 4,27                                      |
| 0,75:1,0          | 9,06                                      |
| 1,0:1,0           | 5,83                                      |

De acordo com o apresentado na Tabela 4.4 evidencia-se que a razão 0,75:1,0 foi a qual apresentou o resultado mais satisfatório, em média tal razão foi 1,77 vezes maior que as demais apresentadas. Em comparação com os autores Singh e Behera (2009) que obtiveram produção específica de 4,71 mg L<sup>-1</sup>, mesmo com a produção nominal de 82,5 mg L<sup>-1</sup> o meio utilizado pelos autores mostrou-se mais propenso a favorecer o crescimento celular que a biossíntese do tacrolimo.

Realizando uma comparação entre os resultados apresentados nesta Tese entre os meios MPL e GPL, ambos na razão C:N 0,50:1,0, pode-se observar a diferença entre ambos. O meio MPL alcançou uma produção específica na ordem de 2,32 vezes maior, porém a produção celular foi de 34,08 % acima do alcançado com a glicose como fonte primária de carbono. Outra diferença observada consiste no tempo levado para se obter a produção máxima do tacrolimo, com o meio MPL o pico da produção ocorreu em 144 horas, ao passo que o meio GPL apresentou a produção máxima em 120 horas.

A diferença entre as produções específicas pode ser atribuída a supressão por glicose, como apresentado no Capítulo 2. Fontes de carbono de fácil assimilação tendem a suprimir a produção de metabólitos secundários e, após a exaustão da fonte primária, o microrganismo passaria a consumir as fontes secundárias, que nesta Tese estão presentes nas fontes complexas de nitrogênio, e assim passaria a produzir os metabólitos (SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

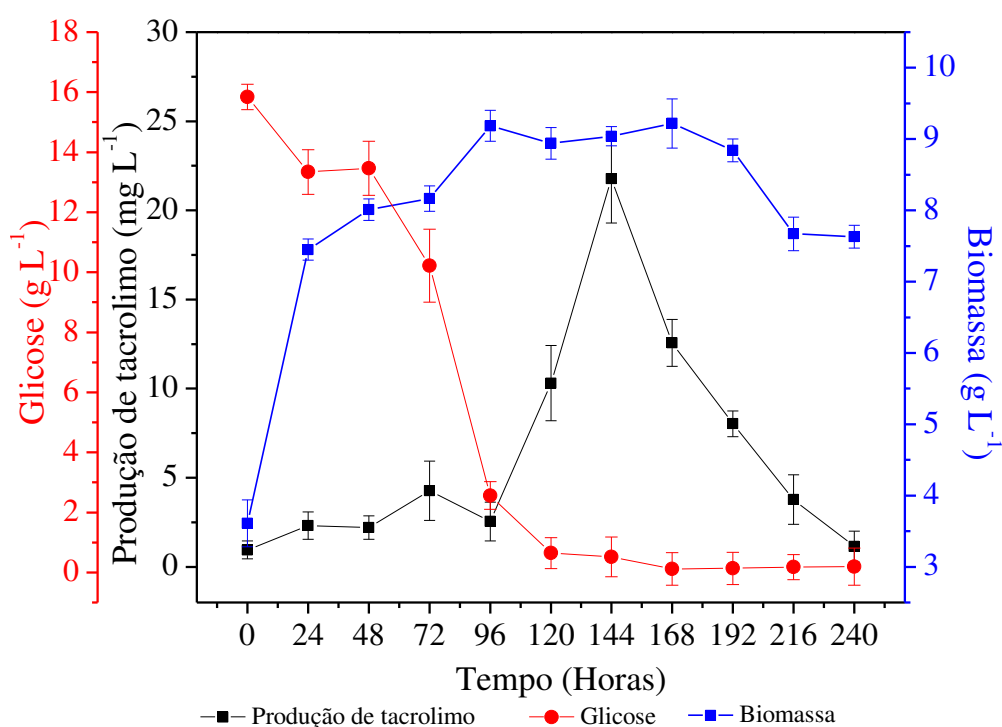
Realizando uma comparação entre os consumos de glicose ao longo da fermentação e traçando um paralelo com a produção do tacrolimo, pode-se perceber que as razões 0,25:1,0 e 0,75:1,0 apresentam o consumo máximo da glicose em 72 horas e

144 horas, entretanto o pico da produção do tacrolimo ficou em 144 horas e 168 horas, para as razões citadas. A razão 0,5:1,0 tem o consumo de glicose e a produção do tacrolimo em tempos iguais, em 120 horas. A razão 1,0:1,0 apresentou o consumo máximo de glicose em 192 horas, muito após a biossíntese máxima do tacrolimo registrada em 72 horas, isso pode ser explicado devido ao excesso de glicose presente no meio.

#### 4.8 FERMENTAÇÕES COM MEIO GPL SUPLEMENTADO COM L-LISINA E ÁCIDO PICOLÍNICO.

Assim como ocorreu a suplementação do meio MPL, o meio GPL também foi suplementado com L-lisina e ácido picolínico nas proporções 0,1 e 0,0025 %. A Figura 4.24 apresenta os resultados de produção de tacrolimo, acúmulo de biomassa e o consumo de glicose ao decorrer de 240 horas de fermentação por *S. tsukubaensis* do meio GPL com L-lisina.

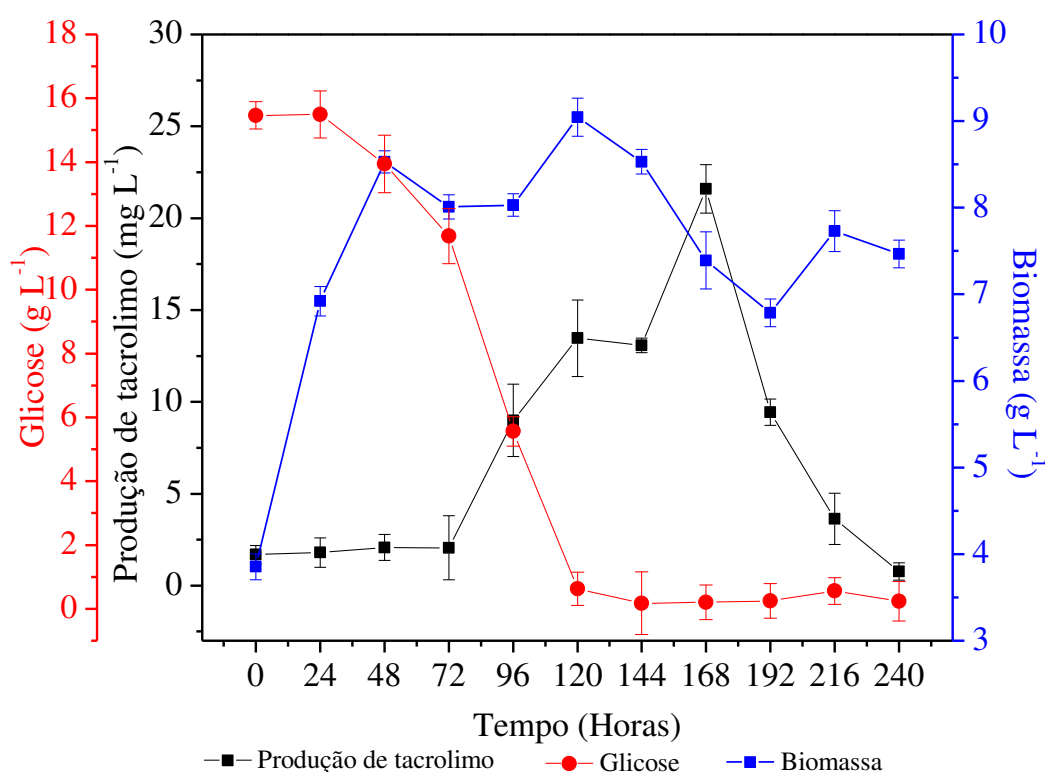
Figura 4.24 – Fermentação com meio GPL com razão C:N nominal de 0,5:1,0 suplementado com L-lisina



A suplementação do meio GPL, na razão C:N nominal de 0,5:1,0 com 0,1 % de L-lisina, não demonstrou ser favorável, uma vez que a produção específica teve uma redução de 1,77 vezes, quando comparada à produção específica apresentada na Tabela 4.3 com meio não suplementado na razão 0,5:1,0. Ainda se evidencia que mesmo após o consumo máximo da glicose, ainda houve um leve crescimento bacteriológico, o que pode ser atribuído à presença de carbono nas fontes de nitrogênio. Os autores Singh e Behera (2009) utilizaram L-lisina e glicose na formulação do meio de cultivo, porém, obtiveram uma produção específica de  $5,10 \text{ mg g}^{-1}$ , 2,40 vezes superior ao alcançado nesta Tese. Ressalta-se que a bactéria utilizada pelos autores não foi a *S. tsukubaensis*.

A suplementação com ácido picolínico, ao meio GPL, ocorreu na mesma proporção estudada a adicionada ao meio MPL, 0,0025 %, e os resultados estão apresentados na Figura 4.25.

Figura 4.25 – Fermentação com meio GPL com razão C:N 0,5:1,0 suplementado com ácido picolínico



Os meios suplementados com L-lisina e ácido picolínico apresentaram maiores valores de produção de biomassa, quando comparados com meio sem suplementação

com razão C:N 0,5:1,0 utilizado nesta Tese. O meio com L-lisina apresentou uma produção máxima celular na ordem de 5,25 % e o meio com ácido picolínico, 3,31 % superior ao meio não suplementado.

Em se tratando de produção máxima do tacrolimo, os meios suplementados não apresentaram resultados satisfatórios. Produção máxima de 21,77 mg L<sup>-1</sup> para o meio suplementado com 0,1% de L-lisina; e 21,60 mg L<sup>-1</sup> para o meio contendo 0,025% de ácido picolínico. O uso do ácido picolínico como precursor do tacrolimo foi citado por Turlo *et al.*, 2012 e, na formulação dos meios utilizados pelos autores, a fonte primária de carbono era a maltose. Porém, apenas a título de comparação ilustrativa, fazendo um paralelo com os resultados obtidos pelos autores e os apresentados nesta Tese, percebe-se que o valor de produção máxima de tacrolimo está na mesma ordem de grandeza, ao redor de 20-22 mg L<sup>-1</sup>, entretanto, a concentração máxima de biomassa relatada pelos autores é inferior a descrita na Figura 4.25, os autores obtiveram concentração de biomassa média entre 2-2,5 g L<sup>-1</sup>; o que torna a produção específica 3 vezes maior que a apresentada nesta Tese.

O meio GPL quando suplementado com L-lisina ou ácido picolínico tende a atenuar a produção do tacrolimo, porém, não possui efeitos significativos na produção de células, o que torna a produção específica menor. Além disso, os meios suplementados apresentaram atraso na produção máxima do tacrolimo. O meio contendo L-lisina apresentou o ápice de produção em 144 horas e, o meio com ácido picolínico em 168 horas, ao passo que o meio sem suplementação obteve a produção máxima em 120 horas. Este fator é um fator relevante para a projeção de ampliação de escala.

#### **4.9 FERMENTAÇÕES COM MEIO MPL E VARIAÇÕES NA RAZÃO CARBONO/NITROGÊNIO**

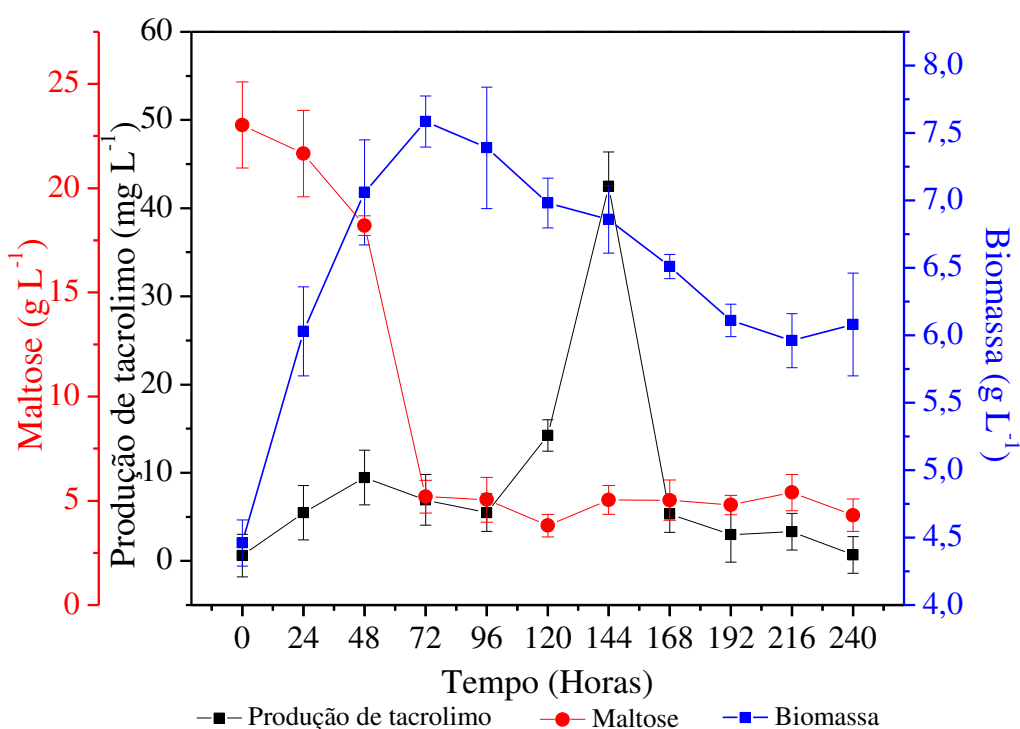
Após as fermentações preliminares com o meio MPL com razão C:N nominal de 0,5:1,0 e com meios suplementados com L-lisina e ácido picolínico, optou-se por realizar fermentações com variações na razão C:N, como o ocorrido com o meio GPL. As proporções estudadas foram as mesmas descritas na Tabela 4.2, entretanto, devido a não observação de uma melhora significativa com os meios suplementados com L-lisina e ácido picolínico, tanto com o meio GPL como nas fermentações apresentadas nas

Figuras 4.13, 4.14 e 4.15, decidiu-se por não realizar fermentações com meio MPL e suplementação.

As condições das fermentações com variação na razão C/N e meio MPL foram as mesmas já descritas: pH inicial de 7,2, temperatura constante de 28 °C e 130 rpm com duração de 10 dias. Ressalta-se que as fontes de nitrogênio usadas são do mesmo lote que as quais foram analisadas no Centro de Qualidade Analítica, Tabela 4.1.

A Figura 4.23 apresenta os dados referentes à fermentação com meio MPL e razão C:N nominal de 0,25:10.

Figura 4.26 – Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 0,25:1,0



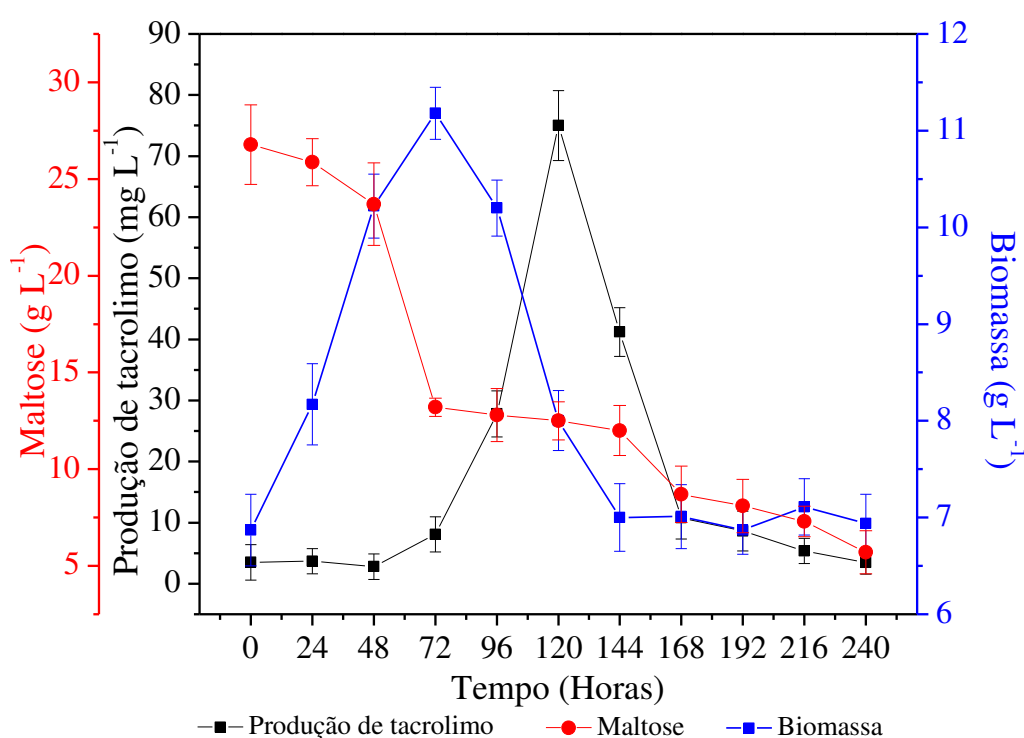
Percebe-se que, a fermentação com meio MPL na razão 0,25:1,0, foi pouco superior a fermentação com as mesmas condições com glicose como fonte primária de carbono. A produção máxima para ambos os meios ocorreu às 144h, o meio MPL apresentou uma produção específica de 6,19 mg g<sup>-1</sup> o que representa ganho de 13,99 %, quando comparado ao meio GPL.

Os trabalhos de Turło *et al.* (2012) e Gajzlerska, Kurkowiak e Turło (2015) utilizaram a maltose como fonte principal de carbono, na proporção nominal de 0,5:1,0, utilizando a peptona de soja e o licor íngreme de milho como fontes de nitrogênio.

Gajzlerska, Kurkowiak e Turło (2015) utilizaram 0,25% de propileno glicol como suplementação ao meio. A suplementação aumentou a produção nominal, porém a produção específica teve uma redução, ficando em  $4,7 \text{ mg g}^{-1}$ , com a síntese máxima de tacrolimo em 168 horas.

A Figura 4.27 representa os dados de uma fermentação conduzida por 10 dias, 130 rpm e  $28^\circ\text{C}$ , com uma razão C:N nominal de 0,5:1,0, como a apresentada pelos autores Turło *et al.* (2012) e Gajzlerska, Kurkowiak e Turło (2015).

Figura 4.27 – Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 0,50:1,0

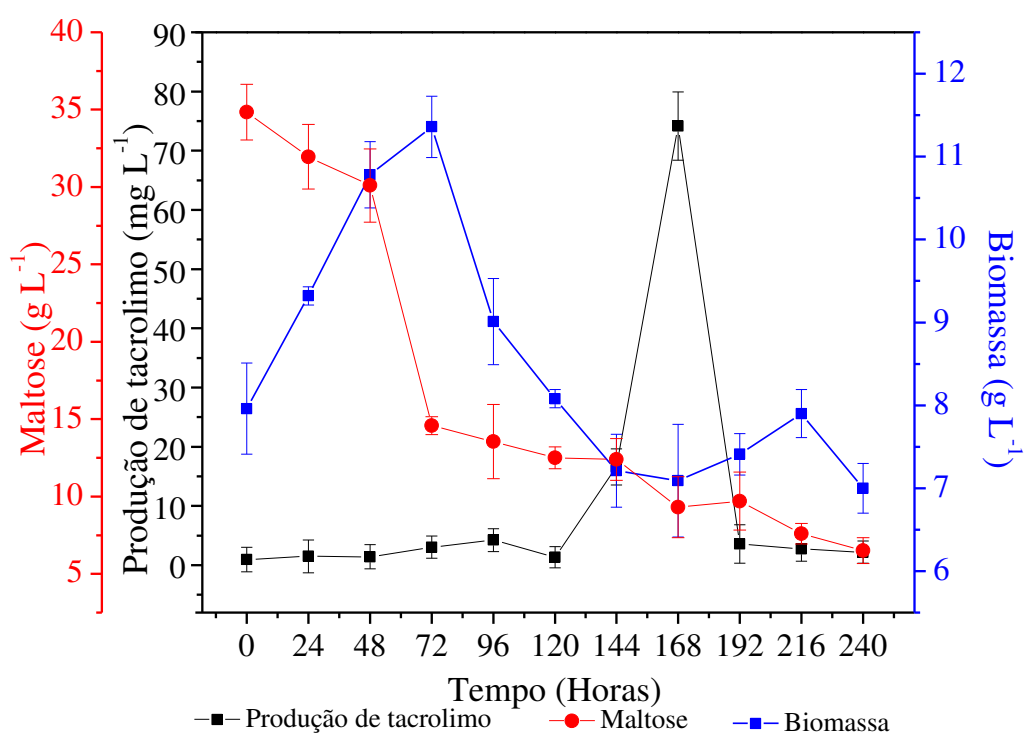


Fazendo uma comparação com os resultados apresentados por Turło *et al.* (2012), que utilizaram o mesmo meio com variações de processo,  $30^\circ\text{C}$  e 110 rpm, nota-se que os resultados apresentados na Figura 4.27 tiveram um ganho em produção muito expressivo, na ordem de 10 vezes à produção dos autores. Turło *et al.* (2012) obtiveram, ao redor de  $7 \text{ mg L}^{-1}$ , como produção máxima de tacrolimo e  $3 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa. A produção específica apresentada na Figura 4.27 é quatro vezes maior que a relatada pelos autores. Tal efeito demonstra que a temperatura tem uma forte influência na dinâmica de fermentação por *S. tsukubaensis* para a produção do tacrolimo.

A Figura 4.13 representa uma fermentação com as mesmas condições da Figura 4.27, porém com uma produção máxima de tacrolimo 54,6 % acima, essa variação pode ser atribuída às bactérias. As bactérias utilizadas para a fermentação da Figura 4.13 foram as quais vieram diretamente no CPQBA, ao passo que as quais foram utilizadas na Figura 4.27 eram provenientes de uma placa mais velha. Entretanto, a produção específica de ambas as fermentações ficou no mesmo patamar,  $9,91 \text{ mg g}^{-1}$  e  $9,37 \text{ mg g}^{-1}$  para as Figuras 4.13 e 4.27. A produção máxima de tacrolimo ocorreu em períodos diferentes do processo fermentativo, na Figura 4.13 deu-se em 144 horas, ao passo que na Figura 4.27 ocorreu em 120 horas.

Os resultados da fermentação com razão C:N 0,75:1,0 é apresentada na Figura 4.28, a qual expõe os valores médios de produção de tacrolimo no decorrer do processo fermentativo, bem como o crescimento celular e o consumo de maltose ao longo da fermentação.

Figura 4.28 – Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 0,75:1,0

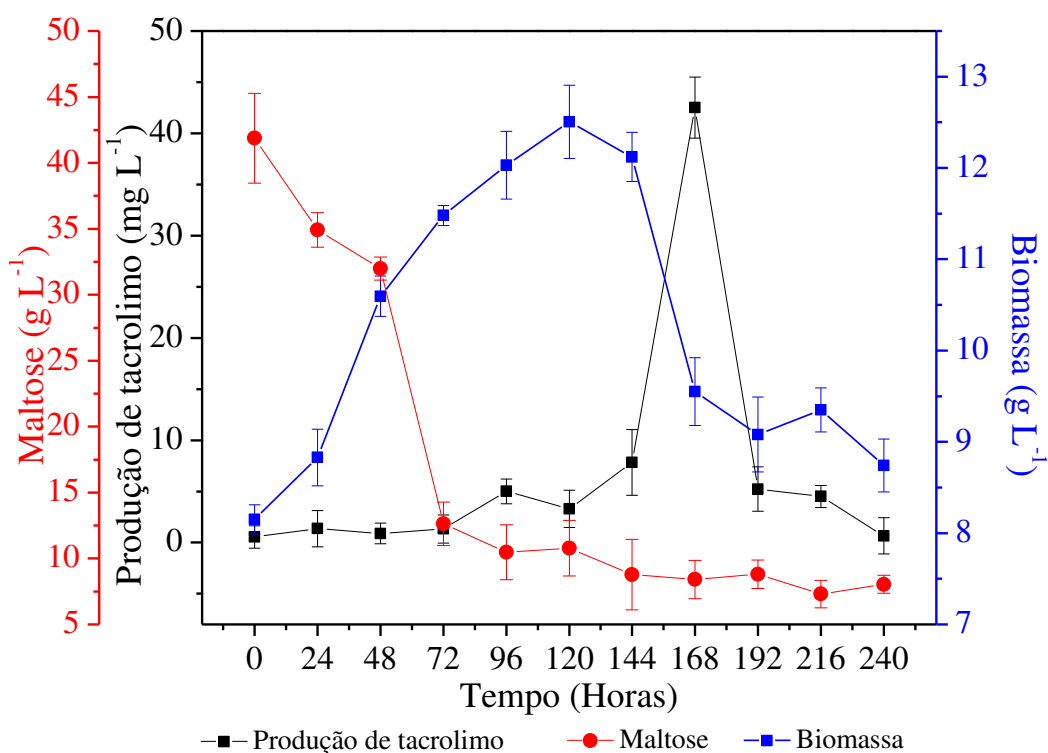


A produção alcançada com a razão entre carbono e nitrogênio de 0,75:1,0 foi similar a apresentada com a condição anteriormente estudada, na ordem de  $75 \text{ mg L}^{-1}$ , assim como a produção de células foi equiparada, o que leva a uma produção específica

com pouca variação:  $9,37 \text{ mg g}^{-1}$  e  $10,5 \text{ mg g}^{-1}$  para as Figuras 4.27 e 4.28. A produção máxima de tacrolimo ocorreu em tempos distintos para os casos estudados, o meio com razão C:N maior levou mais tempo para atingir o pico da produção, 168 horas; 48 horas a mais que o meio com razão 0,5:1,0.

A razão C:N 1,0:1,0 também foi avaliada nos mesmo moldes já descritos para as demais fermentações. Os resultados obtidos estão representados graficamente na Figura 4.29.

Figura 4.29 – Fermentação com meio MPL com razão C:N nominal de 1,0:1,0



A produção média de tacrolimo com a razão C:N 1,0:1,0 foi a mesma obtida com a razão 0,25:1,0, ambas as produções na ordem de 75 % abaixo da média da produção máxima de tacrolimo para as razões 0,5:1,0 e 0,75:1,0.

Em se tratando da fermentação com razão 1,0:1,0, com fontes primárias distintas de carbono apresentadas nesta Tese, pode-se analisar que a produção nominal com maltose ficou 21,29 % abaixo do valor encontrado para a glicose, Figura 4.23, e a produção específica apresentou um valor na ordem de 31,24 % a menos. Outro fator preponderante é o tempo da produção máxima de tacrolimo pelas bactérias, a glicose

apresentou o pico de produção em 72 horas, e com a maltose como fonte primária de carbono a produção máxima ocorreu em 168 horas, o que poderia caracterizar a glicose como uma fonte de carbono de assimilação mais rápida. Entretanto, tal comportamento foi visualizado apenas para a razão 1,0:1,0, com as demais razões a produção máxima de tacrolimo ocorreu no mesmo tempo, tanto para a glicose como para a maltose, variando apenas a produção de células.

#### 4.10 ANÁLISE DE RAZÃO DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO PARA A FASE EXPONENCIAL DA FERMENTAÇÃO

Como apresentado no Capítulo 2, durante a fase exponencial pode ser calculado a velocidade de crescimento específico, por meio da Equação (2.3). À semelhança da Equação (2.3), pode ser obtida a velocidade de produção específica, por meio da Equação (4.1) (NIELSEN, 2012).

$$\mu_P = \frac{1}{P} \frac{dP}{dt} \quad (4.1)$$

em que ( $\mu_P$ ) representa a velocidade de produção específica para o tacrolimo ao longo do processo exponencial de crescimento; e ( $P$ ) representa o valor de produção do tacrolimo.

Tabela 4.5 – Dados de velocidade de crescimento específico para biomassa e tacrolimo

| Meio                     | Velocidade de crescimento específico de biomassa $\mu$ (h <sup>-1</sup> ) | Velocidade de produção específica tacrolimo $\mu_P$ (h <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| MPL                      | 0,0042                                                                    | 0,049                                                                  |
|                          | 0,0065                                                                    | 0,017                                                                  |
| MPL com L-lisina         | 0,0028                                                                    | 0,012                                                                  |
| MPL com ácido picolínico | 0,0034                                                                    | -                                                                      |
| MPL (0,75:1,0)           | 0,0041                                                                    | 0,015                                                                  |
| GPL (0,75:1,0)           | 0,0025                                                                    | -                                                                      |

Os dados utilizados para a obtenção da velocidade de crescimento específico e velocidade de produção específica ficaram restritos aos valores de biomassa e tacrolimo obtidos entre 24 e 72 horas para todos os valores apresentados na Tabela 4.5.

A Tabela 4.5 demonstra que a maltose apresenta melhor velocidade de crescimento específico em todos os casos. A razão carbono/nitrogênio 0,75:1,0 apresentou um resultado 64 % mais favorável. A velocidade de produção específica não foi possível ser calculada, no intervalo de tempo de crescimento exponencial, devido a configuração irregular de produção neste período. A L-lisina incorreu em uma redução na velocidade de produção específica, quando comparada ao meio MPL com razão 0,5:1,0 carbono/nitrogênio.

#### 4.11 – ANÁLISE DE CUSTOS DAS MATÉRIAS PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE TACROLIMO COM OS MEIOS ESTUDADOS

As fontes de carbono, glicose e maltose, são os compostos com maior peso na variação do valor final de cada meio de produção. Isso se dá pelo fato de a maltose ser 40 vezes mais cara que a glicose, com base em orçamentos do mês de novembro de 2017.

Tabela 4.6 – Custos para a produção de 1 grama de tacrolimo

| Meio                     | Produção<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Produção específica<br>(mg g <sup>-1</sup> ) | Custo (R\$) |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|-------------|
| MPL                      | 116,30                            | 9,91                                         | 474,17      |
|                          | 75                                | 9,37                                         | 735,27      |
| MPL com L-lisina         | 102,08                            | 8,61                                         | 539,04      |
| MPL com ácido picolínico | 71,93                             | 6,29                                         | 791,68      |
| MPL (0,75:1,0)           | 74,15                             | 10,5                                         | 903,38      |
| GPL (0,75:1,0)           | 58,74                             | 9,06                                         | 614,45      |

A Tabela 4.6 apresenta o custo das matérias primas para a produção de 1 grama de tacrolimo. Entretanto, o valor apenas representa o custo para as matérias primas para a produção do tacrolimo não purificado, ou seja, apenas o fármaco contido no caldo

fermentado. A Tabela 4.6 não contempla os custos para o processo necessário para a quantificação analítica em *HPLC*.

A Tabela 4.6 aponta que o meio MPL apresentou o menor custo efetivo para a produção de 1 grama de tacrolimo não purificado. O meio MPL apresentou duas produções distintas, como evidencia-se na Tabela 4.6, os custos entre ambas as produções variam em 55,06 %.

O custo do meio MPL suplementado com 0,0025 % de ácido picolínico, de acordo com a Tabela 4.6, apresentou o pior resultado, uma vez que a produção específica ficou muito abaixo das demais apresentadas e, ainda, tem um custo de produção relativamente elevado.

De acordo com orçamento pedido junto a Sigma-Aldrich em novembro de 2017, o padrão de tacrolimo ( $\geq 98$  %) custa 1765,00 reais cada 5 mg. Os custos para a produção das 5 mg, não purificadas, variou entre 2, 37 e 4,52 reais.

O medicamento Prograf<sup>®</sup> da Astellas Pharma Inc. contém 1 mg de tacrolimo em sua formulação. Baseando-se nos dados apresentados na Tabela 4.5, pode-se constatar que o valor para a produção de 1 mg de tacrolimo varia entre 0,47 e 0,90 reais, lembrando que este valor é referente apenas para o custo de produção e não contempla o processo de purificação do fármaco. O custo de farmácia do Prograf<sup>®</sup> situa-se entre 400-685 reais a caixa contendo 100 cápsulas, ou seja, cada cápsula varia entre 4 e 6,85 reais. Estes valores apontam que o grande custo do tacrolimo para a produção com pureza necessária para fins farmacológicos, pode estar associado às etapas do processo de purificação.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

Este trabalho teve como principal objetivo a produção do tacrolimo via fermentação pela bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, sendo o primeiro do gênero no Laboratório de Processos de Transferência de Massa, DEPro, FEQ, UNICAMP e, com exceção à Libbs farmacêutica que passou a produzir o fármaco no Brasil, trata-se da primeira Tese na área de produção.

A fermentação preliminar, conduzida a 30 °C, foi uma reprodução do trabalho de Turlo *et al.* (2012), porém com a adição da L-lisina em uma batelada. A produção nominal dos autores ficou abaixo da alcançada nesta Tese, entretanto, a produção específica dos autores foi ao redor de 5 vezes à aqui reportada. Essa discrepância pode ser atribuída as fontes de nitrogênio, uma vez que os autores não especificaram a marca e, como ficou claro pelos testes realizados na peptona de soja e licor íngreme de milho, ambas possuem elevada quantidade de carbono, e este resultado pode ter favorecido apenas ao crescimento bacteriológico e não ao metabolismo secundário, nas condições avaliadas. Os meios fermentativos suplementados com a L-lisina e ácido picolínico não apresentaram o desempenho reportado pela Literatura, tendo os três meios: meio sem aditivos, meio com 0,1 % de L-lisina e meio com 0,0025 % de ácido picolínico apresentaram produção específica máxima na ordem de 0,50 mg g<sup>-1</sup>, valor muito baixo quando comparado a valores descritos na Literatura. Entre os dados das fermentações preliminares vale ressaltar que o ácido picolínico fez com que a produção máxima do tacrolimo ficasse em 144 horas, ao passo que os meios sem suplementação e com L-lisina, 168 horas.

Posteriormente às fermentações preliminares foram conduzidas fermentações a 28 °C e 130 rpm de agitação, com maltose como fonte de carbono, na razão 0,5:1,0 de carbono/nitrogênio e meios com 0,1 % de L-lisina e 0,0025 % de ácido picolínico. Pode-se perceber que a pequena variação de processo acarretou incremento significativo na produção, partindo de 9,13 mg L<sup>-1</sup> a 30 °C para 116,3 mg L<sup>-1</sup> a 28 °C, para os meios não suplementados. Ressalta-se ainda que a variação na temperatura levou a uma redução significativa na produção de células sem que isso interferisse no metabolismo secundário, uma vez que a média da produção específica a 28 °C foi 17 vezes maior que a alcançada a 30 °C.

As condições de processo para os resultados obtidos com as razões C:N avaliadas, basearam-se nos testes preliminares, ou seja, 130 rpm e 28°C. Os dados alcançados para a maltose e glicose apresentaram resultados de produção específica variados. O maior valor alcançado foi com a razão 10,47 mg g<sup>-1</sup>, este na razão 0,75:1,0 com maltose como fonte primária de carbono. Entretanto, a mesma razão com glicose entregou uma produção específica de 9,06 mg L<sup>-1</sup>, pouca diferença entre ambas. Contudo, quando considera-se o valor da glicose e da maltose, percebe-se que apenas a produção específica não tem sustentação para delinear um projeto em larga escala da produção do tacrolimo.

Outro fator crucial para o projeto de ampliação de escala de produção está no tempo máximo de produção pelas bactérias, o maior valor obtido situou-se entre 120 e 168 horas, contudo, a razão 1,0:1,0 com glicose demonstrou uma síntese mais rápida, 72 horas. Além disso, as análises realizadas no CQA comprovaram a elevada presença de carbono orgânico em ambas as fontes de nitrogênio utilizadas nesta Tese, o que torna necessário um total conhecimento das fontes complexas de nitrogênio, sendo relevante um estudo de açúcares fermentescíveis presentes em cada uma.

Conclui-se, portanto, que a bactéria *Streptomyces tsukubaensis* é capaz de catabolizar tanto a maltose quanto a glicose para a geração do tacrolimo e, que em termos de produção nominal, a maltose apresentou os melhores resultados. Entretanto, quando considera-se a produção específica, ambas as fontes apresentaram um resultado semelhante.

Como sugestões para trabalhos futuros pode-se deixar:

- realizar estudo do impacto do pH na produção do tacrolimo na bactéria *Streptomyces tsukubaensis*, uma vez que na Literatura (Mishra e Verma, 2009; Xia *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017) encontra-se uma vasta gama de fermentações com variações de pH;
- analisar a peptona de soja e o licor íngreme de milho com o intuito de identificar possíveis açúcares fermentescíveis e amino ácidos;
- avaliar o uso de outros açúcares como fontes de carbono como a frutose;
- conduzir fermentações com bactérias do gênero *Streptomicetae* encontrada em solo brasileiro, e com isso, deixar o produto o mais nacional possível. Bem como, substituir a peptona de soja (de origem italiana) utilizada nesta Tese por alguma

equivalente, de origem nacional, assim como estudar o efeito do uso da água de maceração de milho;

- avaliar o uso de óleos como fonte primária de carbono, como exemplo o óleo de castanha do Brasil, óleo de milho, óleo de soja e demais óleos encontrados no mercado de origem vegetal;
- realizar fermentações com variação em micro nutrientes;
- realizar estudos cinéticos na fermentação, para com isso avaliar melhor as fases *log* e *lag*;
- estudar a possibilidade de suplementação de fontes de carbono e/ou nitrogênio ao longo do processo fermentativo;
- reproduzir os melhores dados apresentados nesta Tese em um biorreator, para com isso obter uma melhor noção de ampliação de escala.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

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

AHARONOWITZ, Y. Nitrogen Metabolite Regulation of Antibiotic Biosynthesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, p. 209-233, 1980.

AHARONOWITZ, Y.; DEMAINE, A. L. Influence of Inorganic Phosphate and Organic Buffers on Cephalosporin Production by *Streptomyces clavuligerus*. **Archives of Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 169-173, 1977.

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

ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. Drugs obtained by biotechnology processing. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 199-207, 2011.

ANDERSON, T. M. Industrial Fermentation Processes. *In*: SCHAECHTER, M. Encyclopedia of Microbiology. 3 ed. v. 1, p. 349-361, **Elsevier Academic Press**, San Diego, 2009, 600p.

AMAYA, T.; HIROI, J.; LAWRENCE, I. D. Tacrolimus and Other Immunosuppressive Macrolides in Clinical Practice. *In*: OMURA, S. Macrolide Antibiotics Chemistry, Biology, and Practice. 2 ed. p. 421-452, **Elsevier Academic Press**, San Diego, 2002, 623p.

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

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; FERNÁNDEZ, F. J.; TOMASINI, A. Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 322-333.

BARTLETT, S. T.; SCHWEITZER, E. J.; JOHNSON, L. B.; KUO, P. C.; PAPADIMITRIOU, J. C.; DRACHENBERG, C. B.; KLASSEN, D. K.; HOEHN-SARIC, E. W.; WEIR, M. R.; IMBEMBO, A. L. Equivalent Success of Simultaneous Pancreas Kidney and Solitary Pancreas Transplantation A Prospective Trial of Tacrolimus Immunosuppression with Percutaneous Biopsy. **Annals of Surgery**, v. 224, n. 4, p. 440-452, 1996.

BÉRDY, J. Recent Developments of Antibiotic Research and Classification of Antibiotics According to Chemical Structure. *In*: PERLMAN, D. Advances in Applied Microbiology. v. 18, p. 309-402, **Elsevier Academic Press**, New York, 1974, 407p.

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

CASTRO, A. P. B. M. Inibidores de calcineurina no tratamento das dermatoses alérgicas. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 166-172, 2006.

CIANI, M.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I. Ecological Processes | Fermentation. *In*: JØRGENSEN, S. E.; FATH, B. D. Encyclopedia of Ecology, v. 2, p. 1548-1557, **Elsevier Science**, Amsterdam, 2008, 3120p.

CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 361, n. 1469, 2006.

CHEN, C.; ZHAO, X.; CHEN, L.; JIN, Y.; ZHAO, Z. k.; SUH, J-W. Effect of overexpression of endogenous and exogenous *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins on tacrolimus (FK506) production in *Streptomyces* sp. KCCM11116P. **Royal Society of Chemistry**, n. 5, v. 21, p. 15756-15762, 2015.

CHEN, D.; ZHANG, Q.; ZHANG, Q.; CEN, P.; XU, Z.; LIU, W. Improvement of FK506 Production in *Streptomyces tsukubaensis* by Genetic Enhancement of the Supply of Unusual Polyketide Extender Units via Utilization of Two Distinct Site-Specific Recombination Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5093-5103, 2012.

CHOCAIR, P.; LANHEZ, L.; ARAP, S.; SABBAGA, E.; DULEY, J.; SIMMONDS, H. A.; CAMERON, J. S. Low-dose allopurinol plus azathioprine/cyclosporine/prednisolone, a novel immunosuppressive regimen. **The Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 83-84, 1993.

CHOI, B-T.; HAM, Y-B.; YU, S-S.; JEONG, K-IL.; KIM, B-S. Method for refining of high purity of tacrolimus. **US Patent 8,362,238 B2**, 29 jan. 2013. 8p.

CORUM, C. J.; STARK, W. M.; WILD, G. M.; BIRD JR. H. L. Biochemical Changes in a Chemically Defined Medium by Submerged Cultures of *Streptomyces erythreus*. **Applied Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 326-329, 1954.

CVAK, L.; BUCHTA, M.; JEGOROV, A.; BLATNY, P.; KERI, V.; CSORVASI, A.; SIMON, A.; MAKÓ, G. Process for purifying tacrolimus. **US Patent 2008/0000834 A1**, 3 jan. 2008. 13p.

DAI, Y.; HEBERT, M. F.; ISOHERRANEN, N.; DAVIS, C. L.; MARSH, C.; SHEN, D. D.; THUMMEL, K. E. Effect of CYP3A5 Polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 5, p. 836-847, 2006.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, 1999.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. Emerging Concepts of Secondary Metabolism in Actinomycetes. **ACTINOMYCETOLOGICA**, v. 9, n. 2, p. 98-117, 1995.

DYSON, P. *Streptomyces*. In: SCHAECHTER, M. Encyclopedia of Microbiology. 3. ed, v. 2, p. 318-332, **Elsevier Academic Press**, San Diego, 2009, 470p.

EL-MANSI, E. M. T.; WARD, F. B.; CHOPRA, A. P. Microbiology of Industrial Fermentation: Central and Modern Concepts. In: EL-MANSI, E. M. T.; BRYCE, C. F.A.; DAHHOU, B.; SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L.; ALLMAN, A. R. Fermentation Microbiology and Biotechnology. 3. ed, p. 9-36, **CRC Press**, Boca Raton, 2012, 535p.

GAJZLERSKA, W.; KURKOWIAK.; TURŁO, J. Use of three-carbon chain compound as biosynthesis precursors to enhance tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis*. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 32-39, 2015.

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

GARCIA, V. D.; PACHECO, L. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2009-2016). **Registro Brasileiro de Transplantes Ano XXII**, n. 4, 2016.

GARCIA, V. D.; PACHECO, L. Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estados e instituição no período: Janeiro/Setembro – 2017. **Registro Brasileiro de Transplantes Ano XIII**, n. 3, 2017.

GARRITY, G. M.; HEIMBUCH, B. K.; MOTAMEDI, H.; SHAFIEE, A. Genetic relationships among actinomycetes that produce the immunosuppressant macrolides FK506, FK520/FK523 and rapamycin. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 42-47, 1993.

GONTIJO, B.; DUARTE, I. A. G.; SITTART, J. A. S.; PIRES, M. C.; TAKAOKA, R.; CESTARI, S. C. P.; CESTARI, T. F.; AUN, W. T.; OLIVEIRA, Z. N. P.; SCALA, C. S. K. L. Avaliação da eficácia e segurança do tacrolimo pomada 0,03% no tratamento da dermatite atópica em pacientes pediátricos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 6, p. 511-519, 2008.

GORANOVIČ, D.; BLAŽIČ, M.; MAGDEVSKA, V.; HORVAT, J.; KUŠČER, E.; POLAK, T.; SANTOS-ABERTURAS, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, M.; BARREIRO, C.; MRAK, P.; KOPITAR, G.; KOSEC, G.; FUJS, S.; MARTÍN, J. F.; PETKOVIĆ, H. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis*. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 238, p. 1-15, 2012.

GRANT, D. Current results of intestinal transplantation. **The Lancet**, v. 347, n. 9018, p. 1801-1803, 1996.

GRIMES, P. E.; MORRIS, R.; AVANISS-AGHAJANI, E.; SORIANO, T.; MERAZ, M.; METZGER, A. 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, 2004.

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

HANIFIN, J. M.; RAJKA, G. Diagnostic features of atopic dermatitis. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 92, p. 44-47, 1980.

HOGAN, A. C.; MCAVOY, C. E.; DICK, A. D.; LEE, R. W. Long-term efficacy and tolerance of tacrolimus for the treatment of uveitis. **Ophthalmology**, v. 114, n. 5, p. 1000-1006, 2007.

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

HWANG, K-S.; KIM, H. U.; CHARUSANTI, P.; PALSSON, B. Ø.; LEE, S. Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 255-268, 2014.

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

JAMES, P. D. A.; EDWARDS, C. The effects of Temperature on Growth and Production of the Antibiotic Granaticin by a Thermotolerant Streptomycete. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 7, p. 1997-2003, 1989.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1 ed, p. 273-397, **Editora UNICAMP**, Campinas, 2006, 445p.

JEGASOTHY, B. V.; ACKERMAN, C. D.; TODO, S.; FUNG, J. J.; ABU-ELMAGD, K.; STARZL, T. E. Tacrolimus (FK 506) – A New Therapeutic Agent for Severe Recalcitrant Psoriasis. **Archives of Dermatology**, v. 128, n. 6, p. 781-785, 1992.

JOE, J. H.; LEE, W. M.; PARK, Y-J.; JOE, K. H.; OH, D. H.; SEO, Y. G.; WOO, J. S.; YONG, J. S.; YONG, C. S.; CHOI, H-G. Effect of the solid-dispersion method on the solubility and crystalline property of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 161-166, 2010.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 74, n. 3, p. 524-534, 2007.

JUNG, S.; LEE, K.; PARK, Y-JE.; YOON, S.; YOO, Y. J. Process Development for Purifying Tacrolimus from *Streptomyces* sp. Using Adsorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 6, p. 1208-1213, 2011.

JUNG, S.; MOON, S.; LEE, K.; PARK, Y-J.; YOON, S.; YOO, Y. J. Strain development of *Streptomyces* sp. for tacrolimus production using sequential adaptation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1467-1471, 2009.

LIBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 44-51, 1988.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006.

KERI, V.; CSORVASI, A.; MELCZER, I.; SIMON, A. Method of purifying tacrolimus. **US 2006/0142565 A1**, 29 jan. 2006. 8p.

KEILIN, D.; HARTREE, E. F. The Use of Glucose Oxidase (Notatin) for the Determination of Glucose in Biological Material and for the Study of Glucose-producing Systems by Manometric Methods. **Biochemical Journal**, v. 42, n. 2, p. 230-238, 1948.

KIM, H. S.; PARK, Y. I. Lipase Activity and Tacrolimus Production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 Mutant Strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1638-1644, 2007.

KIM, E-S.; HONG, H-J.; CHOI, C-Y.; COHEN, S. N. Modulation of Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces lividans* by Glucose Repression of *afsR2* Gene Transcription. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 7, p. 2198-2203, 2001.

KIM, H. S.; PARK, Y. I. Isolation and Identification of a Novel Microorganism Producing the Immunosuppressant Tacrolimus. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 418-421, 2008.

KINO, T.; HATANAKA, H.; HASHIMOTO, M.; NISHIYAMA, M.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. **Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1249-1255, 1987a.

KINO, T.; HATANAKA, H.; MIYATA, S.; INAMURA, N.; NISHIYAMA, M.; YAJIMA, T.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. **Journal of Antibiotics**, v. 40, n. 09, p. 1256-1265, 1987b.

KINOSHITA, S.; UDAKA, S.; SHIMONŌ, M. Studies on the amino acid fermentation Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 193-205, 1957.

KOLTER, R.; SIEGELE, D. A.; TORMO, A. The Stationary Phase of the Bacterial Life Cycle. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 855-874, 1993.

LAUERMA, A. I.; MAIBACH, H. I.; GRANLUND, H.; ERKKO, P.; KARTAMAA, M.; STUBB, S. Inhibition of contact allergy reactions by topical FK506. **The Lancet**, v. 340, n. 8818, p. 556, 1992.

MADAR, D.; DEKEL, E.; BREN, A.; ZIMMER, A.; PORAT, Z.; ALON, U. Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. **BMC Systems Biology**, v. 7, n. 136, p. 1-13, 2013.

MAIER, R. M. Bacterial Growth. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Environmental Microbiology. 2. ed, p. 38-54, **Elsevier Academic Press**, San Diego, 2009 598p.

MARTIN, J. F.; DEMAIN, A. L. Control of Antibiotic Biosynthesis. **Microbiological Reviews**, v. 44, n. 2, p. 230-251, 1980.

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

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

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

MEIER-KRIESCHE, H. -U.; LI, S.; GRUESSNER, R. W. G.; FUNG, J. J.; BUSTAMI, R. T.; Barr, M. L.; Leichtman, A. b. Immunosuppression: Evolution in Practice and Trends, 1994-2004. **American Journal of Transplantation**, n. 6, v. 2, p. 1111-1131, 2006.

MEISER, B. M.; PFEIFFER, M.; SCHMIDT, D.; REICHENSPURNER, H.; UEBERFUHR, P.; PAULUS, D.; SCHEIDT, W. v.; KREUZER, E.; SEIDEL, D.; REICHART, B. Combination Therapy with Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil Following Cardiac Transplantation: Importance of Mycophenolic Acid Therapeutic Drug Monitoring. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 18, n. 2, p. 143-149, 1998.

MENDES, T. D. Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae). Rio Claro: **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, 2010, 93p, Dissertação de Mestrado.

MEYER, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. **Wiley-VCH**, Weinheim, 4. ed. 2004, 357p.

MIERKE, D. F.; SCHMIEDER, P.; KARUSO, P.; KESSLER, H. Conformational Analysis of the cis- and –trans-Isomers of FK506 by NMR and molecular dynamics. **Helvetica Chimica Acta**, v. 74, n. 5, p. 1027-1047, 1991.

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

MO, S. J.; KIM, D. H.; LEE, J. H.; PARK, J. W.; BASNET, D. B.; BAN, Y. H.; YOO, Y. J.; CHEN, S-W.; PARK, S. R.; CHOI, E. A. KIM, E.; JIN, Y-Y.; LEE, S-K.; PARK, J. Y.; LIU, Y.; LEE, M. O.; LEE, K. S.; KIM, S. J.; KIM, D.; PARK, B. C.; LEE, S-G.; KWON, H. J.; SUH, J-W.; MOORE, B. S.; LIM, S-K.; YOON, Y. J. Biosynthesis of the Allylmalonyl-CoA Unit for the FK506 Polyketide Synthase Proceeds through a Dedicated Polyketide Synthase and Facilitates the Mutasynthesis of Analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 4, p. 976-985, 2011.

MO, S. J.; LEE, S-K.; J, Y-Y.; OH, C-H, SUH, J-W. 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.

MO, S. J.; LEE, S-K.; JIN, Y-Y.; OH, C-H.; SUH, J-W. Application of a combined approach involving classical random mutagenesis and metabolic engineering to enhance FK506 production in *Streptomyces* sp. RM7011. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 97, v. 7, p. 3053-3062, 2013.

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

MOTAMEDI, H.; SHAFIEE, A.I.; CAI, S.-J.; STREICHER, S. L.; ARISON, B. H.; Miller, R. R. Characterization of Methyltransferase and Hydroxylase Genes Involved in the Biosynthesis of the Immunosuppressants FK506 and FK520. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 17, p. 5243-5248, 1996.

MURAMATSU, H.; MOKHTAR, S. I.; KATSUOKA, M.; EZAKI, M. Phylogenetic Analysis of Immunosuppressant FK506-Producing *Streptomyces* Strains. **Actinomycetologica**, v. 19, n. 2, p. 33-39, 2005.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-467, 2007.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NIELSEN, J. Fermentation Kinetics: Central and Modern Concepts *In*: EL-MANSI, E. M. T.; BRYCE, C. F.A.; DAHHOU, B.; SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L.; ALLMAN, A. R. Fermentation Microbiology and Biotechnology. 3. ed, p. 37-75, **CRC Press**, Boca Raton, 2012, 535p

NIELSEN, J. B.; HSU, M.-J.; BYRNE, K. M.; KAPLAN, L. Biosynthesis of the Immunosuppressant Immunomycin: The Enzymology of Pipecolate Incorporation. **Biochemistry**, v. 30, n. 23, p. 5789-5796, 1991.

NISHIKAWA, T.; HASUMI, H.; SUZUKI, S.; KUBO, H.; OHTANI, H. Kinetic Analysis of Molecular Interconversion of Immunosuppressant FK506 by High-Performance Liquid Chromatography. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 12, p. 1785-1789, 1993.

OKAFOR, NDUKA. Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. **Science Publishers**, Nem Hampshire, 2007, 530p.

OLAVO, O. I. Influência de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de retamicina por *Streptomyces olidensis* ICB20. 2006. 155 f. **Tese (Doutorado em Engenharia)** – Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. de L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PARK, J. W.; JUNG, W. S.; PARK, S. R.; PARK, B. C.; YOON, Y. J. Analysis of intracellular short organic acid-coenzyme A esters from actinomycetes using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 9, p. 1136-1147, 2007.

PARK, J. W.; MO, S-J.; PARK, S. R.; BAN, Y-H.; YOO, Y. J.; YOON, Y. J. Liquid chromatography-mass spectrometry characterization of FK506 biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus* KCTC 10561BP. **Analytical Biochemistry**, v. 393, n. 1, p. 1-7, 2009.

PICON, P. D.; GADELHA, M. I. P.; ALEXANDRE, R. F. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Imunossupressão no Transplante Renal. Acessado em 23/11/2017. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Imunossupressao\\_TransplanteRenal.pdf](http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Imunossupressao_TransplanteRenal.pdf).

PROCÓPIO, R. E. de L.; da SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; de AZEVEDO, J. L.; de ARAÚJO, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466-471, 2012.

REICHENSPURNER, H.; KUR, F.; TREEDE, H.; MEISER, B. M.; WELZ, A.; VOGELMEIER, C.; SCHWAIBLMEIER, M.; MÜLLER, C.; FÜRST, H.; BRIEGEL, J.; REICHART, B. Tacrolimus-Based Immunosuppressive Protocols in Lung Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 31, n. 1-2, p. 171-172, 1999.

ROKEM, J. S.; LANTZ, A. E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1262-1287, 2007.

ROLFE, M. D.; RICE, C. J.; LUCCHINI, S.; PIN, C.; THOMPSON, A.; CAMERON, A. D. S.; ALSTON, M.; STRINGER, M. F.; BETTS, R. P.; BARANYI, J.; PECK, M. W.; HINTON, J. C. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686-701, 2012.

ROKNI, G. R.; GOLPOUR, M.; GORJI, A. H.; KHALILIAN, A.; GHASEMI, H. Effectiveness and safety of topical tacrolimus in treatment of vitiligo. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 8, n. 1, p. 29-33, 2017.

ROSEN, M. K.; STANDAERT, R. F.; GALAT, A.; NAKATSUKA, M.; SCHREIBER, S. L. Inhibition of FKBP Rotamase Activity by Immunosuppressant FK506: Twisted Amide Surrogate. **Science**, v. 248, n. 4957, p. 863-866, 1990.

SALM, P.; TAYLOR, P. J.; ROONEY, F. A High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method Using a Novel Atmospheric Pressure Chemical Ionization Approach for the Rapid Simultaneous Measurement of Tacrolimus and Cyclosporin in Whole Blood. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 3, p. 292-300, 2008.

SÁNCHEZ, S.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; ÁVALOS, M.; GUZMÁN-TRAMPE, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; LANGLEY, E.; RUIZ, B. Carbon source regulation of antibiotic production. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 442-459, 2010.

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

SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; ROGERS, R. S. Successful treatment of oral lichen planus-like chronic graft-versus-host disease with topical tacrolimus: a case report. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 4, p. 613-619, 2004.

SAVIC, M.; BRATIC, I.; VASILJEVIC, B. *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2119-2124, 2007.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100-108, 2008.

SCHRADER, K. K.; BLEVINS, W. Geosmin-producing species of *Streptomyces* and *Lyngbya* from aquaculture ponds. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 834-840, 1993.

SHAFFER, P. A.; WILLIAMS, R. D. Sugar Determination by the ferricyanide electrode. **Journal of Biological Chemistry**, v. 111, p. 707-723, 1935.

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

SIGMUND, J. M.; CLARK, D. C.; RAINEY, F. A.; ANDERSON, A. S. Detection of Eubacterial 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductases from Natural Populations of Actinomycetes. **Microbial Ecology**, v. 46, n. 1, p. 106-112, 2003.

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.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945a.

SOMOGYI, M. Determination of blood sugar. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 69-73, 1945b.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19-23, 1951.

SOUZA, M. C. M de. Desenvolvimento de sistemas poliméricos de implantação intraocular contendo tacrolimus para o tratamento de uveítes crônicas. 2012. 147 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STARZL, T. R.; TODO, S.; FUNG, J.; DEMETRIS, A. J.; VENKATARAMMAN, R.; JAIN, A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. **The Lancet**, v. 334, n. 8670, p. 1000-1004, 1989.

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

TAMLER, C.; OLIVEIRA, P. A.; DUQUE-ESTRADA, B.; AVELLEIRA, J. C. R.; Pomada de tacrolimo 0,1% no tratamento de vitiligo: série de casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 169-171, 2011.

TAMURA, S.; AHIKE, A.; IBUKI, R.; AMIDON, G. L.; YAMASHITA, S. Tacrolimus is a Class II Low-Solubility High-Permeability Drug: The Effect of P-Glycoprotein Efflux on Regional Permeability of Tacrolimus in Rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 3, p. 719-729, 2001.

TANAKA, H.; KURODA, A.; MARUSAWA, H.; HATANAKA, H.; KINO, T.; GOTO, T.; HASHIMOTO, M. Structure of FK506: A Novel Immunosuppressant Isolated from *Streptomyces*. **Journal of American Chemical Society**, v. 109, n. 16, p. 5031-5033, 1987.

TURŁO, J.; GAJZLERSKA, W.; KLIMASZEWSKA, M.; KRÓL, M.; DAWIDOWSKI, M.; GUTKOWSKA, B. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 6-7, p. 388-395, 2012.

VAN DUYNE, G. D.; STANDAERT, R. F.; KARPLUS, P. A.; SCHREIBER, S. L.; CLARDY, J. Atomic Structure of FKBP-FK506, an Immunophilin-Immunosuppressant Complex. **Science**, v. 252, n. 5007, p. 839-842, 1991.

VANDAMME, E. J. Production of Vitamins, Coenzymes and Related Biochemicals by Biotechnological Processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 313-327, 1992.

VENKATARAMANAN, R.; WATTY, V. S.; ZEMAITIS, M. A.; SANGHVI, A. T.; BURCKART, G. J.; SELTMAN, H.; TODO, S.; MAKOWKA, L.; STARZL, T. E. Biopharmaceutical Aspects of FK-506. **Transplantation Proceedings**, v. 19, n. 5-6, p. 30-35, 1987.

WAITES, M. J.; MORGAN, N. L.; ROCKEY, J. S.; HIGTON, G. Industrial Microbiology: An Introduction, **Blackwell Science**, London, 2001, 288p.

WAKATA, N.; SAITO, T.; TANAKA, S.; HIRANO, T.; OKA, K. Tacrolimus hydrate (FK506): therapeutic effects and selection of responders in the treatment of myasthenia gravis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 106, n. 1, p. 5-8, 2003.

WANG, J.; LIU, H.; HUANG, D.; JIN, L.; WANG, C.; WEN, J. Comparative proteomic and metabolomic analysis of *Streptomyces tsukubaensis* reveals the metabolic mechanism of FK506 overproduction by feeding soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 06, p. 2447-2465, 2017.

WANG, S.; MAGILL, J. E.; VICENT, F. B. A Fast and Simple High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Method for Simultaneous Measurement of Whole Blood Tacrolimus and Sirolimus. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 129, n. 5, p. 661-665, 2005.

WEZEL VAN, G. P.; MCDOWALL, K. J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. **Natural Products Report**, v. 28, n. 7, p. 1311-1333, 2011.

WINK, M. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. *In*: WINK, Annual Plant Review: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. 2. ed, v. 40, p. 1-19, **Blackwell Publishing**, New Delhi, 2010, 445p.

XIA, M.; HUANG, D.; LI, S.; WEN, J.; JIA, X.; CHEN, Y. Enhanced FK506 Production in *Streptomyces tsukubaensis* by Rational Feeding Strategies Based on Comparative Metabolic Profiling Analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 10, p. 2717-2730, 2013.

YAMASHITA, K.; NAKATE, T.; OKIMOTO, K.; OHIKE, A.; TOKUNAGA, Y.; IBUKI, R.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 267, n. 1-2, p. 79-91, 2003.

YOON, Y. J.; CHOI, C. Y.; 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.

YU, D.; XU, F.; ZENG, J.; ZHAN, J. Type III Polyketide Synthases in Natural Product Biosynthesis. **IUBMB Life**, v. 64, n. 4, p. 285-295, 2012.

ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 407-421, 1999.

ZVERLOV, V. V.; BEREZINA, O.; VELIKODVORSKAYA, G. A.; SCHWARZ, W. H. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 587-597, 2006.

## APÊNDICE A

---

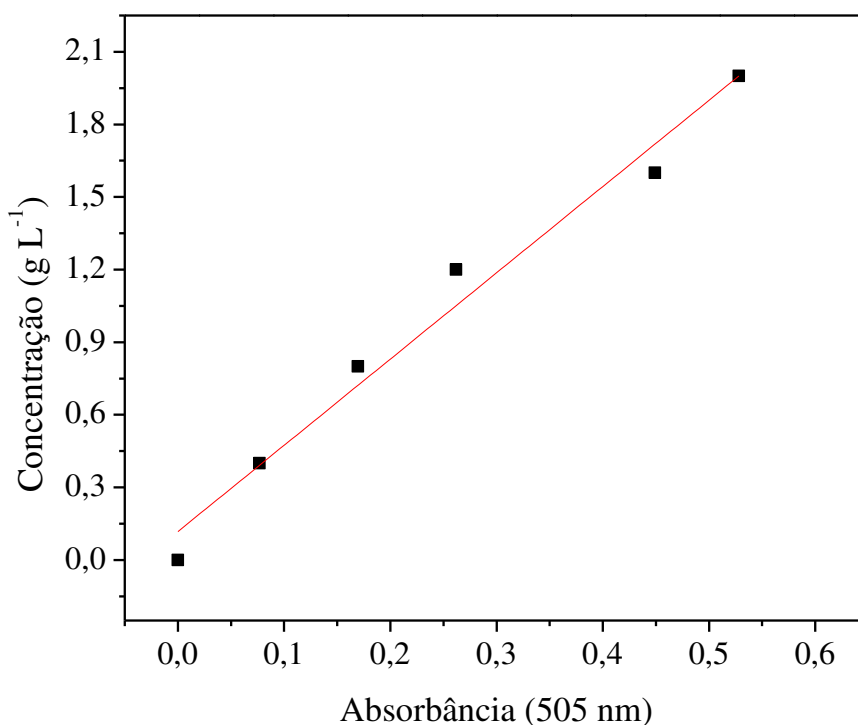
### CURVA DE CALIBRAÇÃO DA GLICOSE E MALTOSE

Com o intuito de avaliar o consumo da glicose ao longo do processo fermentativo, foi construída uma curva de calibração do padrão de glicose. As concentrações utilizadas respeitaram o valor máximo de detecção do método do kit enzimático colorimétrico da Laborclin/Bioliquid.

As concentrações utilizadas foram 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 e 2 g L<sup>-1</sup>. Cada amostra foi feita em triplicata, e os valores de absorbância demonstrados na Figura A1 representam a média entre a triplicata.

A curva de calibração foi feita pelo método enzimático, este método consiste em adicionar 1 mL do kit enzimático a 10 µL das amostras. Após a adição do 1 mL do kit, as amostras eram incubadas a 37 °C por 10 min, transcorrido o tempo, agitava-se as amostras e realizava-se a leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda ajustado para 505 nm.

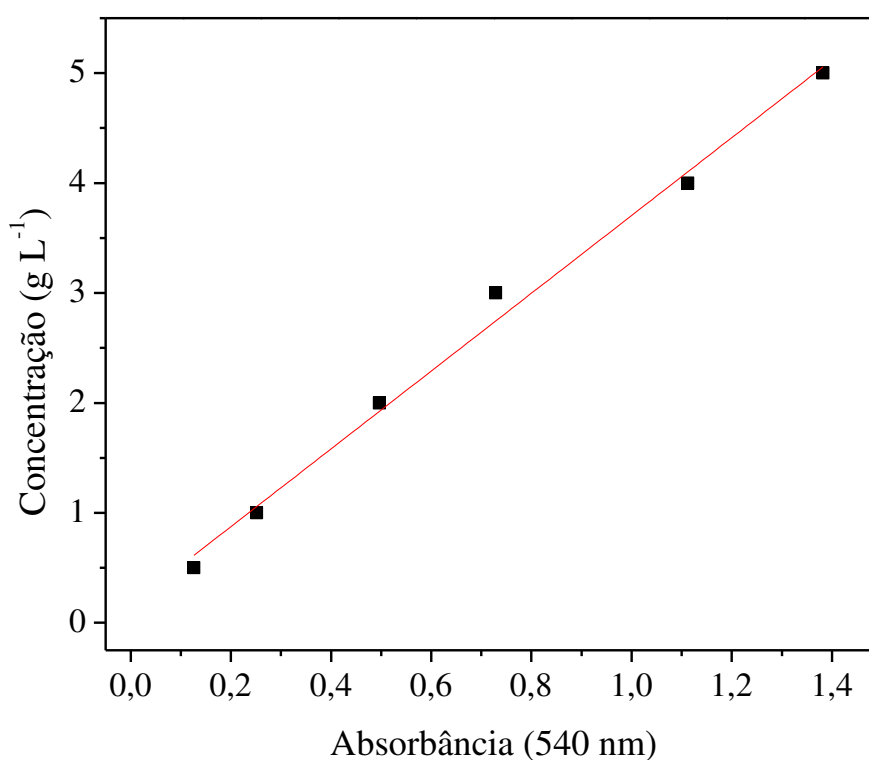
Figura A.1 – Curva de calibração para a glicose



A Figura A.1 apresenta 0,975 como coeficiente de determinação, e um coeficiente angular de 3,565, por meio do qual foi possível obter os valores de consumo de glicose ao longo do processo fermentativo. As amostras coletadas ao longo de todo o processo fermentativo apresentaram um valor médio de concentração de glicose muito superior as concentrações utilizadas para a curva. Portanto, para que se avaliasse o consumo de glicose em cada amostra foi necessário realizar diluições em cada ponto.

Assim como ocorreu com a glicose, foi necessário traçar uma curva de calibração padrão para a maltose. As concentrações utilizadas para tal foram de 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 g L<sup>-1</sup>, e está exposta graficamente na Figura A.2. A curva apresenta 0,9901 como coeficiente de determinação e 3,7087 como coeficiente angular.

Figura A.2 – Curva de calibração para a maltose



## ANEXO A

### LAUDOS DE ENSAIOS CQA.

Figura A.3 – Ensaio de carbono orgânico total e nitrogênio Kjeldahl em licor íngreme de milho

**LAUDOS**  
**Nº 208014**  
**1/1 FNN**  
**EMIÇÃO 01**



**LAUDO DE ENSAIOS LABORATORIAIS**

| INFORMAÇÕES DO CLIENTE                                         |  |  |                                             |  |  |
|----------------------------------------------------------------|--|--|---------------------------------------------|--|--|
| CLIENTE: FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA UNICAMP                |  |  |                                             |  |  |
| ENDEREÇO: ÉRICO VERÍSSIMO, 1251 CAMPUS UNICAMP - BARÃO GERALDO |  |  |                                             |  |  |
| CIDADE: CAMPINAS / SP                                          |  |  | TEL/FAX: (19) 3521-2723                     |  |  |
| CONTATO: LUCAS LESSA DE ARAUJO                                 |  |  | E-MAIL: marcio.fologatti@funcamp.unicamp.br |  |  |
| DATA ENTRADA DA AMOSTRA: 20/12/16                              |  |  | DATA EMISSÃO DO LAUDO: 22/12/16             |  |  |

| RELATÓRIO DE AMOSTRAGEM                                                  |  |  |                                             |  |  |
|--------------------------------------------------------------------------|--|--|---------------------------------------------|--|--|
| ENDEREÇO: ÉRICO VERÍSSIMO, 1251 CAMPUS UNICAMP - BARÃO GERALDO           |  |  |                                             |  |  |
| CIDADE: CAMPINAS / SP                                                    |  |  |                                             |  |  |
| DATA DA AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                        |  |  | TIPO DE MATRIZ (AMOSTRA): ALIMENTO          |  |  |
| HORÁRIO INÍCIO AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                 |  |  | LOTE: NÃO INFORMADO                         |  |  |
| HORÁRIO TÉRMINO AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                |  |  | DATA DE FABRICAÇÃO: NÃO INFORMADO           |  |  |
| RESPONSÁVEL AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                    |  |  | DATA DE VALIDADE: NÃO INFORMADO             |  |  |
|                                                                          |  |  | PLANO: PA- DO CLIENTE - POP: CO- DO CLIENTE |  |  |
| CONDIÇÕES AMBIENTAIS DURANTE AMOSTRAGEM: TEMPERATURA: *NA - UMIDADE: *NA |  |  |                                             |  |  |
| CONDIÇÕES DE RECEBIMENTO DA AMOSTRA: TEMPERATURA: 24°C                   |  |  |                                             |  |  |

**LICOR DE MILHO**

| ENSAIOS                             | UNIDADES | LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO | RESULTADOS | ANÁLISE  |          | MÉTODO                                  |
|-------------------------------------|----------|-------------------------|------------|----------|----------|-----------------------------------------|
|                                     |          |                         |            | INÍCIO   | FINAL    |                                         |
| Carbono Orgânico Total              | % C      | 0,01                    | 12,3       | 21/12/16 | 21/12/16 | AQFST : 2001 / PQ-024-03 <sup>(1)</sup> |
| Teor de Nitrogênio Total (Kjeldahl) | %        | 0,2                     | 1,6        | 22/12/16 | 22/12/16 | USP39 <sup>(2)</sup>                    |

\*NA: NÃO APLICÁVEL    \*\*ND: NÃO DETECTADO    \*\*\*LQ: MENOR QUE O LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

**METODOLOGIA:**  
 (1) AQFST - INSTITUTO AGRÔNOMICO DE CAMPINAS. Análise Química para a avaliação da Fertilidade de Solos tropicais. IAC - Instituto Agrônomo de Campinas-SP, 2001.  
 (2) UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. USP / NF: The official compendia of standards, 39th edition. Rockville: USP, 2016.

**FOTO**



Os resultados das análises laboratoriais apresentadas referem-se exclusivamente à amostra analisada.  
 A reprodução deste documento somente poderá ser feita na íntegra, sendo proibida a reprodução parcial.

Documento assinado digitalmente usando certificados emitidos no âmbito da ICP-Brasil. De acordo com o art. 10 da MP nº 2.200-2 de 24 de agosto de 2002, "As declarações constantes dos documentos em forma eletrônica produzidos com a utilização de processo de certificação disponibilizados pela ICP-Brasil presumem-se verdadeiros em relação aos signatários", tendo a mesma validade jurídica que os documentos em papel com assinaturas manuscritas.

Este certificado atende aos requisitos de acreditação pela Cgcre que avaliou a competência do laboratório e comprovou sua rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades - SI.

DR. MARCELO C. LAZARDNE  
GERENTE TÉCNICO  
CRFSP: 62094 / CRQ: 04157706

CHAVE DE AUTENTICIDADE: q1317g78qojExcAoHob  
Verifique a autenticidade deste laudo informando Laudo/DE

Laboratório ISO/IEC 17025:2005 - Veja escopo em:  
<http://www.cqa.com.br/escopo.htm>

ML-0048-02

[www.cqa.com.br](http://www.cqa.com.br)

Av. Jílio Diniz, 27 • Jd. N. Sra Auxiliadora  
Campinas/SP • CEP 13075-420  
Fone/Fax: (19) 3241-1555

Figura A.4 – Ensaio de carbono orgânico total e nitrogênio Kjeldahl em peptona de soja

**LAUDO/OS**  
N° 208013

**1/1 FNN**

**EMIÇÃO 01**



**CQA** CENTRO DE QUALIDADE ANALÍTICA  
LABORATÓRIOS 30 ANOS

### LAUDO DE ENSAIOS LABORATORIAIS

| INFORMAÇÕES DO CLIENTE                                        |                                             |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| CLIENTE: FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA UNICAMP               |                                             |
| ENDEREÇO: ERICO VERÍSSIMO, 1251 CAMPUS UNICAMP- BARÃO GERALDO |                                             |
| CIDADE: CAMPINAS / SP                                         | TEL./FAX: (19) 3521-2723                    |
| CONTATO: LUCAS LESSA DE ARAUJO                                | E-MAIL: marcio.fologatti@funcamp.unicamp.br |
| DATA ENTRADA DA AMOSTRA: 20/12/16                             | DATA EMISSÃO DO LAUDO: 22/12/16             |

| RELATÓRIO DE AMOSTRAGEM                                                  |                                             |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| ENDEREÇO: ERICO VERÍSSIMO, 1251 CAMPUS UNICAMP- BARÃO GERALDO            |                                             |
| CIDADE: CAMPINAS / SP                                                    |                                             |
| DATA DA AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                        | TIPO DE MATRIZ (AMOSTRA): ALIMENTO          |
| HORARIO INICIO AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                 | LOTE: NÃO INFORMADO                         |
| HORARIO TERMINO AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                | DATA DE FABRICAÇÃO: NÃO INFORMADO           |
| RESPONSÁVEL AMOSTRAGEM: NÃO INFORMADO                                    | DATA DE VALIDADE: NÃO INFORMADO             |
| CONDICÕES AMBIENTAIS DURANTE AMOSTRAGEM: TEMPERATURA: *NA - UMIDADE: *NA | PLANO: PA- DO CLIENTE - POP: CO- DO CLIENTE |
| CONDICÕES DE RECEBIMENTO DA AMOSTRA: TEMPERATURA: 24°C                   |                                             |

### PEPTONA DE SOJA

| ENSAIOS                             | UNIDADES | LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO | RESULTADOS | ANÁLISE  |          | MÉTODO                                   |
|-------------------------------------|----------|-------------------------|------------|----------|----------|------------------------------------------|
|                                     |          |                         |            | INÍCIO   | FINAL    |                                          |
| Carbono Orgânico Total              | % C      | 0,01                    | 44,4       | 21/12/16 | 21/12/16 | AQFST : 2001 / FQ-0247-03 <sup>(1)</sup> |
| Teor de Nitrogênio Total (Kjeldahl) | %        | 0,2                     | 9,89       | 22/12/16 | 22/12/16 | USP39 <sup>(2)</sup>                     |

\*NA: NÃO APLICÁVEL    \*\*ND: NÃO DETECTADO    \*\*\*-LQ: MENOR QUE O LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

**METODOLOGIA:**  
 (1) AQFST - INSTITUTO AGRÔNOMICO DE CAMPINAS. Análise Química para a avaliação da Fertilidade de Solos tropicais. IAC - Instituto Agrônomo de Campinas-SP, 2001.  
 (2) UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. USP / NF: The official compendia of standards, 39th edition. Rockville: USP, 2016.

**FOTO**



Os resultados das análises laboratoriais apresentadas referem-se exclusivamente à amostra analisada.  
 A reprodução deste documento somente poderá ser feita na íntegra, sendo proibida a reprodução parcial.

Documento assinado digitalmente usando certificados emitidos no âmbito da ICP-Brasil. De acordo com o art. 10 da MP n° 2.200-2 de 24 de agosto de 2002, "As declarações constantes dos documentos em forma eletrônica produzidos com a utilização de processo de certificação disponibilizado pela ICP-Brasil presumem-se verdadeiros em relação aos signatários", tendo a mesma validade jurídica que os documentos em papel com assinaturas manuscritas.

Este certificado atende aos requisitos de acreditação pela Cgcre que avaliou a competência do laboratório e comprovou sua rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades – SI.

DR. MARCELO C. LAZARINE  
GERENTE TÉCNICO  
CRFSP: 62094 / CRQ: 04157706

CHAVE DE AUTENTICIDADE: eaFubcmwfaRccrCy0yv

Verifique a autenticidade deste laudo informando Laudo/OS

Laboratório ISO/IEC 17025:2005 - Veja escopo em:

<http://www.cqa.com.br/accreditation.htm>

NIL-0048-02

[www.cqa.com.br](http://www.cqa.com.br)

Av. Júlio Diniz, 27 • Jd. N. Sra Auxiliadora  
Campinas/SP • CEP 13075-420  
Fone/Fax: (19) 3243-1555

## ANEXO B

---

### ARTIGOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

#### **ANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFYING TACROLIMUS IN FERMENTATION BROTH OF *Streptomyces tsukubaensis***

**Jean Vinícius Moreira<sup>1</sup>, Wilson Murilo Ferrari<sup>1</sup>, Telma Teixeira Franco<sup>1</sup>,  
Marco Aurélio Cremasco<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University of Campinas, School of Chemical Engineering.

E-mail: jeanvmoreira@yahoo.com.br

#### ABSTRACT

*The quantitative determination of tacrolimus was studied by using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Due to tacrolimus two kinds of conformational heterogeneity a series of mobile phases were tested, in order to achieve the most suitable one. Each test was performed in a C18 column at 20, 40, and 60 °C. An increasing in temperature and acetonitrile content on mobile phase led to a suitable system to quantify tacrolimus in fermentation broth.*

#### 1. INTRODUCTION

Tacrolimus, also known as FK-506 or Fujimycin, is a 23-membered polyketide macrolide with immunosuppressant activity, it is produced by several *Streptomyces* species. However, it was first reported by Kino et al. (1987) as a product in a culture broth of *Streptomyces tsukubaensis*. Since its approval by U.S. Food and Drug Administration for use in therapeutic treatment of liver transplantation, tacrolimus has been licensed as immunosuppressive drug, and several uses have been reported, such as atopic dermatitis (Park et al., 2009).

Liquid chromatography (LC) methods for quantifying macrolides immunosuppressants have been reported, nevertheless, most of them are focused on therapeutic drug monitoring of the residual immunosuppressant macrolides in biological fluids from clinical trials. Even though these are attractive methods, most of them are unsuitable in monitoring FK-506 production in biosynthesis (Park et al., 2009). In this way, this paper reports the investigation of a suitable quantitative chromatographic method to

evaluate tacrolimus production during fermentation process. However, it does not aim to elucidate impurities, such as proteins, salts and by-products.

## 2. MATERIALS AND METHODS

A standard of tacrolimus (Sigma-Aldrich) was used to prepare a stock solution (100 mg L<sup>-1</sup>) in acetonitrile (Scharlau, Spain. HPLC grade). The injections were performed in a C18 column (ThermoQuest Hyperbond 300 x 3.9 mm) in a high performance liquid chromatography system (HPLC, Shimadzu) equipped with UV detector (SPD-20A), pump (LC-20AT) and controller (CBM-20A). The flow rate maintained at 1.0 mL min<sup>-1</sup> and column temperature set at 20, 40, and 60 °C. The injection volume of the sample was 20 µL and UV detector monitored at 210 nm. In order to evaluate the efficiency of the method, samples of crude broth fermentation were taken and analyzed. Fermentation was carried out for 10 days, and a 10-ml-sample was taken each 24 hours. *Streptomyces tsukubaensis* was used as inoculum.

To ensure that tacrolimus would be measured in fermentation broth, a series of mobile phases were tested, the proportions of water in acetonitrile was as it follows 20, 40, and 60%. Each mobile phase performed in three temperatures (20, 40, and 60 °C).

Each 10-mL fermentation sample had to be prepared before injecting. Sample preparation was a hybrid method of the ones found in literature (Turlo et al., 2012). The extraction and clean up procedure of samples began with adding 10 mL of acetone, in order to extract the tacrolimus, after 1 hour stirring, the sample was filtered in pre-weighted filter paper. The filtered sample was vacuum dried until a yellow oily compound, to the oily phase 3.5 mL of acetonitrile and water phase were added and then, centrifuged, the supernatant was injected into HPLC system.

## 3. RESULTS

Quantitative determination of tacrolimus is complicated, due to its two kinds of conformational heterogeneity. One of these conformational is the cis-trans isomerization involving restricted rotation of the amide bond in pipercolic moiety. Figure 1 shows that at low water content on mobile phase it is not possible to measure tacrolimus itself. At aqueous solution, tacrolimus epimerizes to an intermediate tautomer I (cis) which is converted into tautomer II (cis-trans) and then it reaches an equilibrium containing the three forms (Namiki et al., 2006). The three forms are noted in 20/80 water/acetonitrile content in every temperature evaluated, it is an interesting data if tautomers resolution is desired. The 60/40 ratio of water/acetonitrile presented less than 0.5% of tacrolimus.

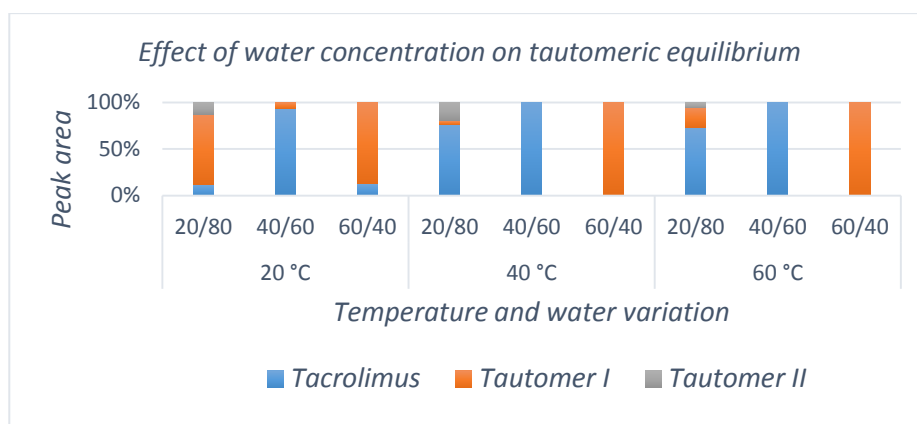


Figure 1. Effect of water concentration and temperature variation on tautomeric equilibrium of a tacrolimus solution.

At 40 °C and 40/60 proportion of water/acetonitrile, tacrolimus was detected; however, this chromatogram showed a problem in peak shape, a long tail. Figure 2 summarizes an injection of tacrolimus standard and a sample of fermentation broth of *S. tsukubaensis*.

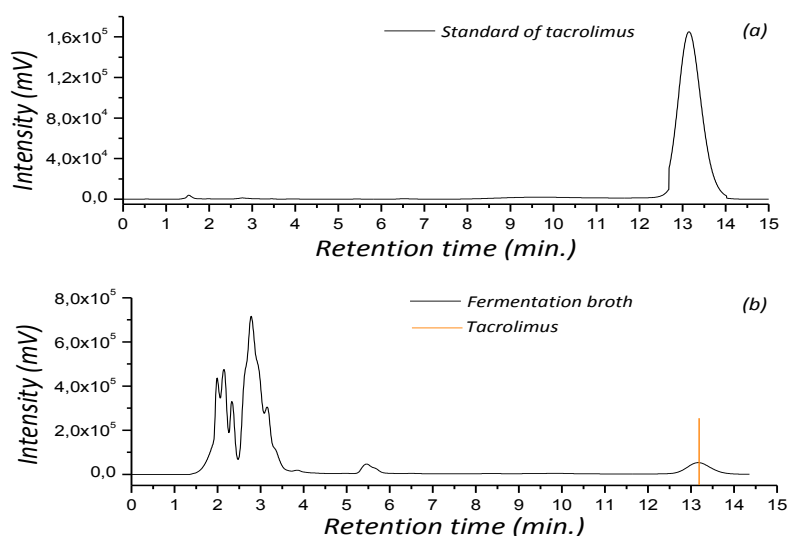


Figure 2. HPLC chromatogram of tacrolimus standard (a), and acetone extract of culture broth of *Streptomyces tsukubaensis* (b).

The chromatogram at Figure 2 (b) is an acetone extract, using water/acetonitrile (40/60) as mobile phase, at 60 °C. It indicates that the method was suitable to identify tacrolimus in extract of fermentation broth. However, it is clear that further studies to purify the samples are indispensable. It was evidenced that as one increases water content on mobile phase the elution order of tacrolimus and its tautomers is reversed, nevertheless, impurities are not affected.

## 4. CONCLUSION

The temperature and water content plays an important role on defining a suitable analytical method to quantify tacrolimus. The water content on mobile phase may lead to an inversion in elution order of tacrolimus and impurities, it would difficult any attempt of the drug purification, once they both elute practically at the same time. To avoid this problem, it was necessary to work at high temperatures (60 °C) and high acetonitrile content on mobile phase (40/60 water/acetonitrile). Low temperatures and low water ratio on mobile phase allowed to elute tautomers separately, it may be interesting to further studies in the biological activity of each tautomer individually.

## 5. REFERENCES

- Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H., 1987. FK-506, A Novel Immunosuppressant Isolated from a *Streptomyces*: I. Fermentation, Isolation, and Physico-Chemical and Biological Characteristics, The Journal of Antibiotics. 40, 1249-1255.
- Park, J.W., Mo, S-J., Park, S.R., Ban, Y-H., Yoo, Y. J., Yoon, Y. J., 2009. Liquid chromatography-mass spectrometry characterization of FK506 biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus* KCTC 10561BP. 393, 1-7.
- Turło, J., Gajzlerska, W., Klimaszewska, M., Król, M., Dawidowski, M., Gutkowska, B., 2012. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. Enzyme and Microbial Technology. 51, 388-395.
- Namiki, Y., Kihara, N., Koda, S., Hane, K., Yasuda, T., 1993. Tautomeric phenomenon of a novel potent immunosuppressant (FK 506) in solution I. Isolation and structure determination of tautomeric compounds. The Journal of Antibiotics. 46, 1149-1155.

# STUDY OF THE ORGANIC SOLVENT FOR LIQUID-LIQUID EXTRACTION OF TACROLIMUS IN FERMENTED BROTH FROM *Streptomyces tsukubaensis*

Wilson M. Ferrari<sup>1</sup>, Jean V. Moreira<sup>1</sup>, Telma T. Franco<sup>1</sup>, Marco A. Cremasco<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Campinas– UNICAMP, Chemical Engineering School

E-mail: wmcferrari@gmail.com

## ABSTRACT

*Tacrolimus, also referred as FK-506, is a potent immunosuppressant approved for the prophylaxis of rejection of allogeneic transplant recipients. It is more potent than Cyclosporine A. FK-506 production is carried out by fermentation. This study aims to select a suitable organic solvent for extracting tacrolimus from treated fermentation broth of Streptomyces tsukubaensis. The solvents that showed the best results were acetonitrile and hexane. Acetonitrile presented the best extraction capacity, while hexane showed the best selectivity.*

## 1. INTRODUCTION

Tacrolimus was discovered by Fujisawa Pharmaceutical Co in 1984 from a culture broth of *Streptomyces tsukubaensis*. Kino et al. (1987) first reported tacrolimus molecular structure consisted of a 23-member macrolide lactone with a hemiketal-masked  $\alpha$ ,  $\beta$ -diketoamide function. It is found usually in its monohydrate form,  $C_{44}H_{69}HO_{12} \cdot H_2O$  (822.05 g/mol).

Product recovery in the downstream process aims to achieve the specified purity level, as well as maximize yield and reduce costs. This task is often challenging since each kind biotechnological process require a specific process. In addition, the downstream process has a high cost. Liquid-liquid extraction is a unitary operation frequently used in the pharmaceutical industry for the recovery and purification of a desirable ingredient from the solution in which it is prepared. The extraction may also be used to remove impurities from a feed stream and it is an important step for purification and it affects all subsequent steps.

This work aims to evaluate which solvent is most suitable for the liquid-liquid extraction in the purification of tacrolimus produced from *Streptomyces tsukubaensis*. Chromatography techniques were used. In this way, area percent and extraction capacity were taken as reference to study the extraction solvents.

## 2. MATERIALS AND METHODS

HPLC (high performance liquid chromatography) determination of tacrolimus was carried out using a Shimadzu system (pump model LC-20AT and controller model CBM-20A) with UV-Vis detector (SPD-20A). A C18 column 300 mm x 3.9 mm (ThermoQuest Hyperbond, 5  $\mu$ m) was used. The standard of tacrolimus was purchased from Sigma. Acetonitrile, acetone, ethanol, isopropanol, hexane and ethyl acetate, all HPLC grade were purchased from Scharlau. The *Streptomyces tsukubaensis* 42081 used in this study was purchased from Leibniz Institute DSMZ.

Fermented broth was produced according to Turlo et al (2012) and it was interrupted on the sixth day. Acetone was added in the volumetric ratio of 1:1. The procedure was necessary to prevent cell growth and to extract the intracellular drug. After a 24-hour stirring, 200 mL from solution with acetone was evaporated under reduced pressure until an oily compound. Tacrolimus concentration in oil was at 100 mg/L. The final volume of the oil was approximately 6 mL. Tacrolimus from oil was extracted by an organic solvent at 1:1 ratio. When organic solvent was added to oil, a second phase was formed. Supernatant formed from oil was centrifuged to remove traces of impurities. Acetonitrile, acetone, ethanol, isopropanol, hexane, and ethyl acetate were employed as organic solvents.

Tacrolimus concentration in organic phase was measured by direct method by HPLC. An isocratic program was carried out at flow rate of 1 mL/min, and temperature was maintained at 60 °C. The mobile phase was composed by acetonitrile and water in volumetric proportion at 60:40 (Chen et al. 2012).

Calibration curve was carried out with standard of tacrolimus. Area percent from chromatogram was evaluated to extraction. The sum of all areas was adopted as the total area of the chromatogram, and area percent of tacrolimus was determined. This method provides information about solvents selectivity used.

## 3. RESULTS

Tacrolimus concentration in all solvent can be observed (Table 1). Acetonitrile showed the greater ability to extract tacrolimus removing almost 95% of tacrolimus from oil. Hexane also presented an interesting extraction capacity. Ethyl Acetate and acetone showed low capacity to extract the tacrolimus from oil.

Table 1. Results of the extraction of tacrolimus with different organic solvents.

| Solvents      | Concentration (mg/L) | Error (mg/L) | Area percent by HPLC |
|---------------|----------------------|--------------|----------------------|
| Acetone       | 27.46                | 2.50         | 1.61%                |
| Acetonitrile  | 94.58                | 7.81         | 0.47%                |
| Ethanol       | 45.66                | 0.60         | -                    |
| Isopropanol   | 58.11                | 1.49         | -                    |
| Ethyl Acetate | 17.69                | 1.09         | 0.07%                |
| Hexane        | 72.25                | 5.52         | 9.32%                |

Area percent of both alcohols cannot be determined because the detector system was saturated by impurities. Hexane showed the best selectivity with tacrolimus area of 9.32% in relation to the total area of the chromatogram, as shown in Table 1. Figure 1 presents the chromatograms of extraction with acetonitrile (best extraction capacity) and hexane (best selectivity).

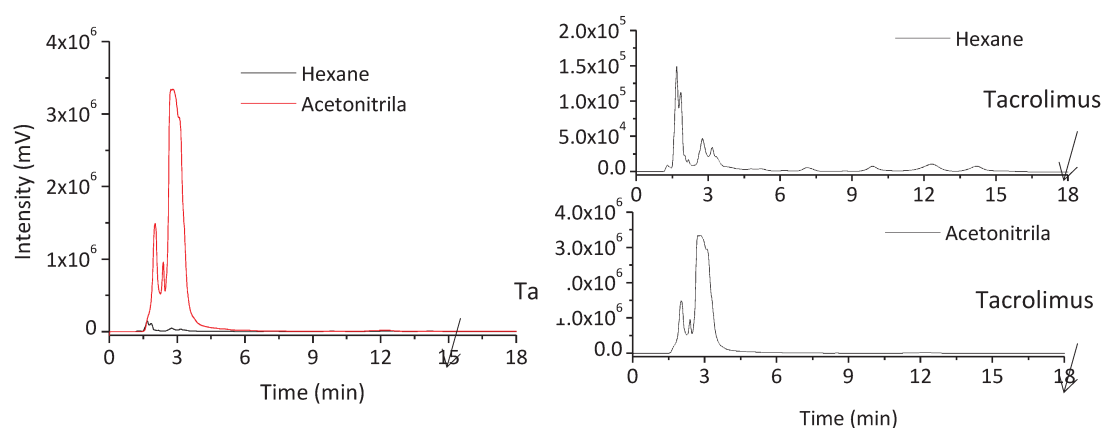


Figure 1. Comparison of the chromatographic areas of extraction between acetonitrile and hexane.

Figure 1 shows both chromatograms in the same graph to illustrate the difference between the areas, as well as each chromatogram separately. The difference of scale in intensity of impurities between the chromatograms is remarkable. Impurities area from acetonitrile extraction is 28 times larger than impurity area from hexane extraction. The high selectivity of hexane is evident in the chromatogram, however, it is important to note that tacrolimus solubility is relatively low in hexane (Kino et al. 1987). In addition, isolated chromatographic peaks, are observed in the chromatogram from hexane extraction.

#### 4. CONCLUSION

Acetonitrile and hexane were the two solvents for extraction of tacrolimus from the fermentation broth of *Streptomyces tsukubaensis* 42081. For extraction with

quantitative purposes it is interesting to use acetonitrile due to its greater extraction capacity. However, if purification is the focus, hexane is indicated due to high selectivity. This characteristic of hexane is relevant for next steps for the purification.

Furthermore, only one wash was performed with the solvents, so extraction with hexane could be optimized. new Peaks in the chromatogram of hexane was observed. There is strong indication that these chromatographic peaks are similar compounds to tacrolimus and, in future works, it would be interesting to identify them.

## 5. REFERENCES

- Turło, J., Gajzlerska, W., Klimaszewska, M., Król, M., Dawidowski, M., & Gutkowska, B., 2012. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. *Enzyme and microbial technology*, 51(6), 388-395.
- Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okurama, M., Kohsaka, M., Aoki, Hatsuo, Imanaka, H., 1987. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of antibiotics*, 40 (9), 1249-1255.
- Chen, D., Zhang, Q., Zhang, Q., Cen, P., Xu, Z., & Liu, W., 2012. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Applied and environmental microbiology*, 78(15), 5093-5103.