

DIFUSÃO ESTOCÁSTICA DE TACROLIMO, CATALASE E BIOMASSA BACTERIANA EM MEIO FERMENTESCÍVEL

STOCHASTIC DIFFUSION OF TACROLIMUS, CATALASE AND BACTERIAL BIOMASS IN FERMENTSCIBLE MEDIUM

Alessandra Suzin Bertan¹

Marco Aurélio Cremasco²

Resumo: A preocupação com a saúde é fundamental em todas as áreas de conhecimento, particularmente quando envolve a população invisível a políticas públicas, que depende de fármacos de alto custo, como é o caso do imunossupressor tacrolimo. O presente trabalho direciona-se à investigação teórica do movimento browniano do tacrolimo, da biomassa bacteriana e da catalase, provenientes da fermentação via *S. tsukubaensis*, em uma solução constituída de caldo fermentescível e acetona (50 % v/v) em duas temperaturas distintas. São apresentados cartogramas bidimensionais que ilustram o deslocamento aleatório das espécies analisadas tendo como ponto de partida o modelo de Langevin. Observa-se maior dispersão do tacrolimo em relação aos demais solutos, assim como o aumento da dispersão com o incremento da temperatura do meio difusivo.

Palavras-chave: Tacrolimo., Catalase., *Streptomyces tsukubaensis*., Difusão estocástica.

Abstract: The cause for concern about health is fundamental in all areas of knowledge, particularly when it involves the invisible people to public policies, which depends on high-cost drugs, such as the immunosuppressant tacrolimus. The present work is directed to the theoretical investigation of the Brownian motion of tacrolimus, bacterial biomass and catalase, from fermentation via *S. tsukubaensis*, in a solution of fermentable broth and acetone (50 % v/v) at two different temperatures. Two-dimensional cartograms are presented to illustrate the random displacement of the analyzed species, using Langevin model as starts of approach. It is observed a greater dispersion of tacrolimus in relation to the other solutes, as well as the increase in dispersion with increasing temperature of the diffusive medium.

Keywords: Tacrolimus., Catalase., *Streptomyces tsukubaensis*., Stochastic diffusion.

1 Introdução

A saúde é uma necessidade intrínseca do ser humano. No Brasil, desde a promulgação da Constituição Federal de 1988, o direito à saúde é universal, incluindo a assistência terapêutica e farmacêutica integral. Em 2002, foram estabelecidos protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas para uso dos medicamentos excepcionais e de alto custo no Sistema Único de Saúde (SUS), dentre os quais os imunossupressores utilizados no transplante renal. Os protocolos clínicos recomendam, para a manutenção do transplante renal, a adoção do esquema de ciclosporina, azatioprina, corticosteroides. Alternativamente, permite-se a substituição da ciclosporina por tacrolimo [1]. Sabe-se, todavia, da pressão pela disponibilização de recursos

¹LPTM/DEPro/FEQ/UNICAMP, Campinas, Brasil (alesuzinbertan@gmail.com)

²DEPro/FEQ/UNICAMP, Campinas, Brasil

em virtude das necessidades competitivas não atendidas, principalmente no campo da assistência farmacêutica. A este respeito, a compilação das despesas na perspectiva do SUS, apontou que o gasto mediano total com procedimentos destinados à manutenção do transplante renal, em pacientes que utilizaram esquemas terapêuticos com tacrolimo, foi superior ao daqueles em esquemas com ciclosporina [1]. Por outro lado, o tacrolimo é até 100 vezes mais potente do que a ciclosporina A quanto à inibição da proliferação de linfócitos T [2], ou seja, mais eficaz quanto à prevenção da rejeição de enxertos em transplantes. Além de utilizado nos protocolos terapêuticos imunossupressores [3], o tacrolimo é indicado para o tratamento de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, líquen plano [4] assim como nos tratamentos dos retinoblastomas [5], de asma brônquica e várias desordens dermatológicas [6], tais como vitiligo [7], psoríase e dermatite atópica [8]. Nota-se, pelo apresentado, que a produção de tacrolimo é urgente e recomendável. Conhecido como FK 506 e fujimicina, o tacrolimo, Figura 1, é uma lactona macrolídea, hidrofílica, pouco solúvel em água e apresenta a fórmula empírica $C_{44}H_{69}NO_{12}$.

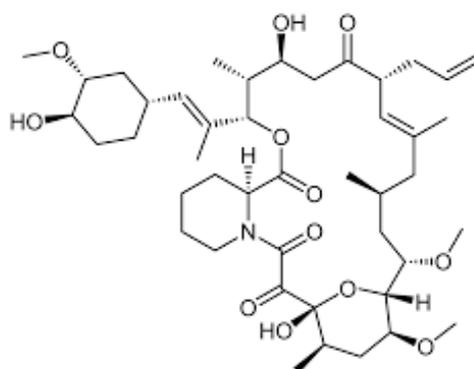


Figura 1. Estrutura molecular do tacrolimo [9].

O FK 506 é obtido via fermentação, originalmente por bactérias *Streptomyces tsukubaensis*, cujos esporos se apresentam no formato cilíndrico, com 0,5 a 0,7 μm em diâmetro e 0,7 a 0,8 μm em comprimento [10], conforme ilustra a Figura 2.

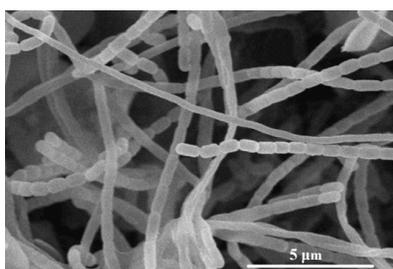


Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura da cepa de *Streptomyces tsukubaensis* [10].

O tacrolimo pode ser produzido via fermentação por outras espécies do gênero *Streptomyces* em meio aquoso nutriente, contendo fontes de carbono (glicose, frutose, sucrose, lactose, maltose, óleos vegetais) e de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, farelo de soja e outras fontes vegetais), assim como sais inorgânicos como, por exemplo, KNO_3 , ureia, preferencialmente em condições anaeróbicas. O meio aquoso é usualmente mantido a pH entre 6,0 a 8,5 no processo fermentativo [11]. Vale ressaltar que, além do tacrolimo, é produzida biomassa bacteriana durante a fermentação, bem como compostos orgânicos, como açúcares e proteínas/enzimas [9], dentre as quais a catalase [12], que apresenta diversas aplicações, tais como no diagnóstico clínico, embalagem de alimentos, remoção de peróxidos da solução de

lentes de contato, corrosão microbiana de metais, tratamento de efluentes e branqueamento na indústria têxtil, produção de queijo e análise da qualidade do leite [13]. É importante a menção que a fermentação em que se obtém tanto o tacrolimo quanto a catalase é interrompida utilizando-se, por exemplo, acetona em igual volume ao caldo fermentado para a lise celular [9]. A partir de então, a solução obtida é submetida a uma sequência de etapas visando a purificação do fármaco e da proteína, envolvendo processos de separação por membranas para a remoção de biomassa bacteriana, açúcares, macromoléculas diversas e sequência de processos adsorptivos destinado à purificação tanto da catalase quanto do tacrolimo sendo que, para este, há a necessidade da etapa de cristalização. Observa-se em tais operações unitárias a presença do fenômeno de transferência de massa, muito em particular da difusão de matéria. Neste sentido, o presente artigo objetiva a simulação do movimento browniano da biomassa bacteriana, tacrolimo e da catalase em uma solução constituída de caldo fermentado via *S. tsukubaensis* e acetona (50 % v/v) em duas temperaturas distintas.

2 Fundamentação teórica

A teoria do movimento browniano assume o movimento aleatório de determinado soluto (A) diluído em meio líquido (B). O movimento de A decorre das colisões sofridas em contato com as moléculas B, tomando direção errática (Figura 3), o que é conhecido como movimento browniano.



Figura 3. Arraste do soluto A devido ao movimento do meio B: as esferas brancas são representativas do soluto, enquanto os pontos representam o meio [14].

O movimento das partículas materiais do meio (ou do solvente B) está associada à sua energia cinética, $k_B T$ (em que k_B é a constante de Boltzmann e T , temperatura), cuja colisões com o soluto provocam o seu arraste, conforme a lei de Stokes, em que a força de arraste é $3\pi\eta_B\sigma_A u_A$, sendo η_B a viscosidade dinâmica do meio; σ_A , diâmetro de Stokes-Einstein do soluto A e u_A a mobilidade desse soluto [15]. Ao se igualar a força de arraste com a força motriz termodinâmica em termos de fração molar do soluto obtém-se, em situação de diluição do soluto, o coeficiente de difusão de Stokes-Einstein [14]

$$D_{AB} = \frac{k_B T}{3\pi\eta_B\sigma_A} \quad (1)$$

O movimento browniano, por sua vez, pode ser descrito a partir do modelo de Langevin, considerando-se o deslocamento aleatório de uma partícula material do soluto A de massa m_A e diâmetro σ_A imersa em um fluido B, de viscosidade dinâmica η_B , segundo

$$m_A \frac{d}{dt} v(t) = -3\pi\eta_B\sigma_A v(t) + \xi(t) \quad (2)$$

Definindo-se o tempo característico de amortecimento viscoso, τ , na forma

$$\tau = \frac{m_A}{3\pi\eta_B\sigma_A} \quad (3)$$

multiplica-se a Equação 2 por $v(t) = v$, bem como se considera a presença da definição 3, obtendo-se

$$v \frac{dv}{dt} = -\frac{1}{\tau} v^2 + \frac{1}{m_A} v \xi(t) \quad (4)$$

Ao se admitir a variação do deslocamento do soluto, r , no tempo, $v = dr/dt$, tem-se da Equação 4,

$$\frac{d^2r}{dt^2} = -\frac{1}{\tau} \frac{dr}{dt} + \frac{1}{m_A} \xi(t) \quad (5)$$

Para tempos longos, $t \gg \tau$, tem-se o movimento browniano no limite viscoso, em que a contribuição stokesiana é significativa a ponto de a contribuição do termo de aceleração, dv/dt na Equação 5, ser desprezível [14], sendo esta retomada segundo

$$\frac{dr}{dt} = \frac{\tau}{m_A} \xi(t) \quad (6)$$

ao ser integrada de $t - \Delta t$ a t ,

$$\int_{t-\Delta t}^t r(t') dt' = \frac{\tau}{m_A} \int_{t-\Delta t}^t \xi(t') dt' \quad (7)$$

A integral associada ao termo aleatório segue o processo de Wiener no intervalo $t - \Delta t$ a t ,

$$r_i - r_{i-1} = \Delta r_i = \Delta W_i \quad (8)$$

em que o incremento ΔW traduz um processo estocástico gaussiano, que apresenta largura da curva normal diretamente proporcional a $(2D_{AB}\Delta t)^{1/2}$ para cada passo i [14], obtido de

$$\Delta r_i = \Delta W_i = R_i \sqrt{2D_{AB}\Delta t} \quad (9)$$

R_i refere-se ao número aleatório i , cuja distribuição de frequência de probabilidade é uma gaussiana de média nula e variância igual a 1, ou $N(0,1)$. Assim, o deslocamento do soluto é descrito no espaço bidimensional a partir da Equação 9 como [16]

$$x(t) = x(t-1) + \beta_A R_i \quad (10)$$

$$y(t) = y(t-1) + \beta_A R_i \quad (11)$$

com

$$\beta_A = \sqrt{2D_{AB}\Delta t} \quad (12)$$

3 Simulação estocástica e resultados

A descrição estocástica do deslocamento do soluto (j): biomassa bacteriana ($j = 1$), tacrolimo ($j = 2$) e da catalase ($j = 3$) em uma solução constituída de caldo fermentescível via *S. tsukubaensis* e acetona (50 % v/v), meio B, segue o processo de Wiener para duas dimensões, segundo

$$r(t) = r(t-1) + \beta_A R_i \quad (13)$$

para $r = x$ e y . A obtenção do cartograma 2D, que descreve o deslocamento do soluto j segue a Equação 12, aqui retomada

$$\beta_j = \sqrt{2D_{jB}\Delta t} \quad (14)$$

D_{jB} é o coeficiente de difusão do soluto j diluído no meio B. De posse dos valores de β_j e o número de passo M , utiliza-se o algoritmo sugerido na Figura 4.

Input: soluto j , M (número de passos),
 randn (números pseudoaleatórios: $N(0,1)$)
 β_j (desvio padrão),
Output: cartograma 2D

```

1:           enquanto i = 0 faça
2:               0 ← xj
3:               0 ← yj
4:           para i = 1 → M faça
5:               randn ← número pseudoaleatório: N(0,1)
6:               x ← x + βj*randn
7:               randn ← número pseudoaleatório – N(0,1)
8:               y ← y + βj*randn
9:           return (leia novo i)
10:          return (leia novo j)
11:          end
  
```

Figura 4. Algoritmo para a descrição do deslocamento do soluto A.

Para a obtenção do valor do coeficiente de difusão, emprega-se a Equação 1, substituindo-se a constante de Boltzmann em unidades adequadas,

$$D_{jB} = 1,465 \frac{T}{\eta_B \sigma_j} \quad (15)$$

com T em Kelvin; η_B , em cP; diâmetro de Stokes-Einstein, σ_A , em Angstrom (Å), e o resultado do D_{jB} em Å²/ns. Uma das dificuldades em relação à Equação 15 reside na definição do diâmetro de Stokes-Einstein, que se refere ao diâmetro característico do soluto. Para a catalase esse valor é igual a $\sigma_3 = 104$ Å [17]. No caso dos demais solutos, busca-se abordagens a partir do conhecimento do volume molar à temperatura normal de ebulição ou, não o conhecendo, de contribuição de grupos, feito o modelo de Le Bas [14, 15]. Tendo em vista a natureza dos solutos (tacrolimo e biomassa bacteriana), recorre-se a estratégias alternativas. Para o tacrolimo ($j=2$), assume-se o valor do diâmetro de Stokes-Einstein, σ_2 , a partir de [18]

$$\sigma_2 = 0,564M_2^{0,47752} \quad (16)$$

visto $M_j = 822,05$ Da; tem-se $\sigma_2 = 13,91$ Å. Para a biomassa bacteriana ($j=1$), considera-se que os esporos apresentem, em média, $d_1 = 0,5$ µm de diâmetro e $L_1 = 0,7$ µm em comprimento. Desse modo, obtém-se o valor de seu diâmetro equivalente, admitindo-o enquanto esfera de igual volume [19]

$$\sigma_1 = \left(\frac{6}{\pi} V_1 \right)^{1/3} \quad (17)$$

O volume do esporo é obtido de [20]

$$V_1 = \frac{\pi}{6} d_1^3 + \pi d_1^2 L_1 \quad (18)$$

resultando em $\sigma_1 = 1,06 \times 10^4$ Å. Visto a 20 °C (293,15 K), $\eta_B = 2,694$ cP e a 30 °C (303,15 K), $\eta_B = 2,361$ cP [21], assim como considerando-se os valores obtidos para o diâmetro de Stokes-Einstein, obtém-se os resultados de D_{jB} (Equação 15) e β_j (Equação 14 para $\Delta t = 1$ ns), que estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Coeficientes de difusão

T (°C)	Grandezas	Biomassa bacteriana	Tacrolimo	Catalase
20	D_{jB} (Å ² /ns)	0,015	11,460	1,534
	β_j (Å)	0,173	4,787	1,752
30	D_{jB} (Å ² /ns)	0,018	13,523	1,810
	β_j (Å)	0,190	5,201	1,903

Assumindo o número de passos, $M = 10^5$, utiliza-se o algoritmo sugerido na Figura 4 para apresentar o cartograma 2D, relativo à influência do tamanho do soluto no seu espalhamento estocástico no meio difusivo a 20°C, na Figura 5, enquanto a influência da temperatura do meio difusivo no deslocamento browniano do tacrolimo está apresentada na Figura 6. Verifica-se, notadamente, a dispersão muito maior do tacrolimo na solução líquida analisada. Já o efeito da temperatura, traduzida na energia cinética $k_B T$, reflete a diminuição da resistência oferecida pelo meio difusivo em decorrência, principalmente, do abrandamento de sua viscosidade

dinâmica. Assim, ao se aumentar a temperatura do meio difusivo, eleva-se a mobilidade do soluto, acarretando em maior dispersão.

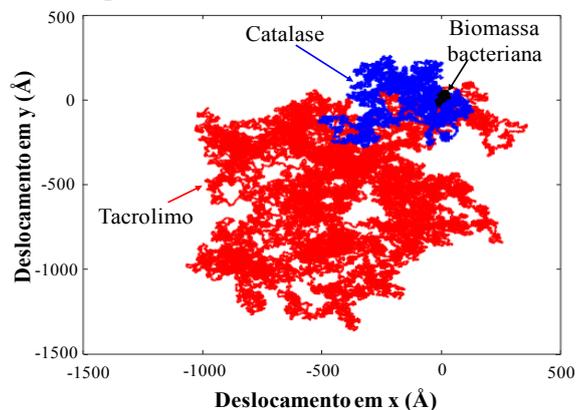


Figura 5. Cartograma 2D ilustrativo da influência do tamanho do soluto no deslocamento estocástico da biomassa bacteriana, do tacrolimo e da catalase em uma solução de caldo fermentescível e acetona (50 % v/v) a 20 °C.

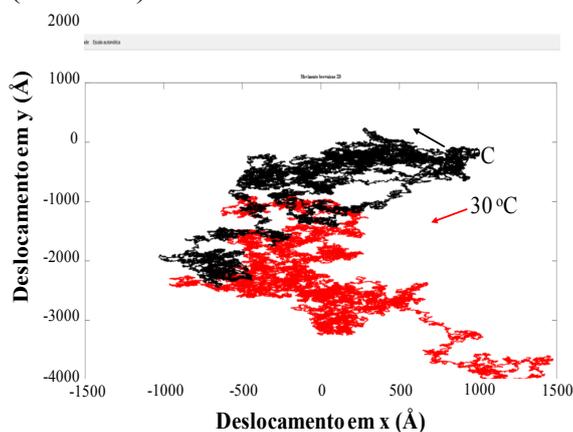


Figura 6. Cartograma 2D ilustrativo da influência da temperatura do meio difusivo no deslocamento estocástico do tacrolimo em uma solução de caldo fermentescível e acetona (50 % v/v).

4 Conclusão

Olhar para as necessidades humana é essencial em qualquer área do conhecimento, incluindo aquelas que envolvem as ciências ditas duras e a tecnologia. Este trabalho direciona-se também à contextualização da problemática da continua falta do imunossupressor tacrolimo a pacientes que dele necessitam. Neste sentido, é imperioso o desenvolvimento de tecnologia para a sua obtenção, seguida de processamento visando a sua purificação. Por outro lado, é essencial o conhecimento de ciência básica que permeia o processo, dentre as quais os fundamentos de transferência de massa. O coeficiente de difusão é uma grandeza associada à facilidade com que determinado soluto se desloca em um meio, sendo dependente de seu tamanho característico, que no presente trabalho está associado ao diâmetro de Stokes-Einstein, tendo em vista a diluição do meio difusivo pretendido pelo modelo de Langevin, assim como da temperatura do referido meio. Evidenciou-se a maior dispersão molecular com o incremento da temperatura do meio, tendo em vista o aumento de sua energia cinética, o qual provoca efeito de arraste no soluto. Também se observou a maior dispersão molecular do tacrolimo quando

comparado ao de biomassa bacteriana e de catalase, indicando estratégias de separação, principalmente por exclusão de tamanho, objetivando a purificação do tacrolimo. Tendo em vista à dimensão da biomassa bacteriana, esta pode ser separada por meio de microfiltração, resultando em permeado rico em macromoléculas, como é o caso da catalase, que pode ser separada empregando-se a ultrafiltração. Seja qual for a técnica de separação, evidencia-se a importância de se conhecer aspectos básicos de difusão mássica.

REFERÊNCIAS

- [1] GUERRA JR, A. A.; ACÚRCIO, F. A.; ANDRADE, E. I. G.; CHERCHILGLIA, M. L.; CESAR, C. C.; QUEIROZ, O. V.; da SILVA, G. D. Ciclosporina versus tacrolimus no transplante renal no Brasil: uma comparação de custos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 1, p.163 –174, jan. 2010.
- [2] CURVELLO NETO, A. L.; COSTA, M. C.; BRUDEMANN, E. A.; YU, L. Atualização em insuficiência renal aguda: nefrotoxicidade aguda de drogas imunossupressoras. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 22, n.2, p. 114 – 120, jun. 2000.
- [3] GARCIA, S. C.; LOPES, L. S.; SCHOTT, K. L; BECK, S. T; POMBLUM, V, J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393 – 401, dez. 2004.
- [4] SANCHEZ, 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, abr. 2004.
- [5] ECKSTEIN, L. A.; VAN QUILL, K. R.; BUI, S. K.; UUSITALO, M. S.; O'BRIEN, J. M. Cyclosporin a inhibits calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling and induces apoptosis in retinoblastoma cells. **Invest Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 3, p. 782 –790, mar. 2005.
- [6] GOMES, C. T. V.; CASTRO, I. M. B. D.; COLLI, G. M.; GOZZANO, M, C. C.; BELTRÃO, A. R; SHIGA, A. S.; RAMOS, V. C. S. Dermatomiosite juvenil e tacrolimus: eficácia nas lesões cutâneas refratárias. In: 34º. Congresso da SUMEP, São Paulo. Anais []. Sorocaba: SUMEP, 2018.
- [7] TAMLER, C.; DUQUE-ESTRADA, B.; OLIVEIRA, P. A.; AVELLEIRA, J. C. R. Pomada de tacrolimus 0,1% no tratamento de vitiligo: serie de casos. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 167 – 169, out. 2011.
- [8] CHAUDHARI, N. D.; TALANIKER, H. V.; GUPTA, S.; GUPPA, A.; DESMUKH, P.; RIZVI, A. Topical tacrolimus: A boom to dermatology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 188 – 192, nov. 2012.
- [9] BERTAN, A. S.; SILVA, S. C. M.; CREMASCO, M. A. Production of tacrolimus using coconut oil as an alternative to glucose. **Acta Scientiarum Technology**, v. 43, n. 1, p. e55721, set. 2021a.
- [10] MURAMATSU, H.; NAGAI, K. *Streptomyces tsukubaensis* sp. nov., a producer of the immunosuppressant tacrolimus. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, p. 251 – 254, 2013.
- [11] MISHRA, A.; VERMA, S. Optimization of process parameters for tacrolimus (FK 506) production by new isolate of *Streptomyces* sp. using response surface methodology. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, n. 4, p. 419 – 425, out. 2012.
- [12] WANG, J.; LIU, H.; HUANG, D.; JIN, L.; WANG, C.; WEN, J. Comparative proteomic and metabolomics analysis of *Streptomyces tsukubaensis* reveals the metabolic mechanism of FK506 overproduction by feeding soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 2447 – 2465, mar. 2017.

-
- [13] KAUSHAL, J.; MEHANDIA, S.; SINGH, G.; RAINA, A.; ARYA, S. K. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192 – 199, out. 2018.
- [14] CREMASCO, M. A. **Difusão mássica**. São Paulo: Blucher, 2019. 284 p.
- [15] CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa**. 3. ed. São Paulo: Blucher, 2015. 460 p.
- [16] MEDVED, A.; DAVIS, R.; VASQUEZ, P. A. Understanding fluid dynamics from Langevin and Fokker–Planck equations. **Fluids**, v. 5, n. 1, p. 40 – 63, mar. 2020.
- [17] HORIIKE, K.; TOJO, H.; YAMANO, T.; NOZAKI, M. Interpretation of the Stokes radius of macromolecules determined by gel filtration chromatography. **Journal of Biochemistry**, v. 93, p. 99 – 106, jan. 1983.
- [18] MORÃO, A. M.; NUNES, J. C.; SOUSA, F.; de AMORIM, M. T. P.; ESCOBAR, I. C.; QUEIROZ, J. A. Development of a model for membrane filtration of long and flexible macromolecules: application to predict dextran and linear DNA rejections in ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 336, p. 61 – 70, mar. 2009.
- [19] CREMASCO, M. A. **Operações unitárias em sistemas particulados e fluidomecânicos**. 3. ed. São Paulo: Blucher, 2018. 424 p.
- [20] GAVEAU, A.; COETSIER, C.; ROQUES, C.; BACCHIN, P.; DAGUE, E.; CAUSSERAND, C. Bacteria transfer by deformation through microfiltration membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 523, p. 446 – 455, fev. 2017.
- [21] BERTAN, A. S.; AYALA, J. S.; CASTILHO, G. J.; CREMASCO, M. A. Rheological models of broth from fermentation via *Streptomyces tsukubaensis* to obtain tacrolimus. In: 23^o. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Rio Grande do Sul. Anais []. Gramado:COBEQ, 2021b.