



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617599-6 A2**

(22) Data de Depósito: 21/09/2006
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)



* B R P I 0 6 1 7 5 9 9 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C07H 1/06 2006.01
C07H 3/04 2006.01
C07H 5/02 2006.01

(54) Título: **PROCESSO DE DESACILAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS DE DERIVADOS CLORADOS DE AÇÚCAR**

(30) Prioridade Unionista: 22/09/2005 IN 1175/MUM/2005

(73) Titular(es): Pharmed Medicare PVT. Ltd.

(72) Inventor(es): Archana Avinash Kotiya, Arvind M. Lali, Manish Vardharaj Petkar, P. Subramaniyam, Rakesh Ratnam, Sundeep Aurora

(74) Procurador(es): Simbolo Marcas e Patentes Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT IN2006000385 de 21/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/054973 de 18/05/2007

(57) Resumo: PROCESSO DE DESACILAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS DE DERIVADOS CLORADOS DE AÇÚCAR. Que consiste em um processo para a produção de triclorogalactosacarose, no qual a desacilação de sacarose-6-éster é obtida ao submeter a mistura de reação, após a cloração, a neutralização e o ajuste do pH entre 6,5 e 7, à desacilação, por meio do uso de uma enzima lipase ou de uma enzima protease, de uma forma livre ou imobilizada.

**“PROCESSO DE DESACILAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS DE DERIVADOS
CLORADOS DE AÇÚCAR”**



PI0617599-6

Campo Técnico

Trata-se a presente invenção de um processo inovador e
5 uma estratégia original para a produção de 1,6-dicloro-1-6-dideoxi-beta-
fructofuranosil-4-cloro-4-deoxi-galactopiranosídeo (TGS), que envolve a
desacilação enzimática de TGS 6-O-protégido obtido após a reação de cloração.

Fundamentos da Invenção

As estratégias dos métodos da técnica anterior de
10 produção de 4, 1', 6'-triclorogalactosacarose (TGS) geralmente envolvem a
cloração de sacarose-6-éster por meio do uso do reagente Vilsmeier-Haack
derivado de sacarose-6-éster clorada, para a formação de 6-acetil-4,1', 6'-
triclorogalactosacarose, por meio do uso de diversos agentes de cloração, como,
por exemplo, oxiclreto de fósforo, cloreto de oxalila, pentaclreto de fósforo, etc.,
15 e uma amida terciária, como, por exemplo, dimetilformamida (DMF). Após a dita
reação de cloração, a massa de reação é neutralizada até atingir o pH entre 7,0 e
7,7, por meio do uso de hidróxidos alcalinos apropriados de cálcio, sódio, etc. O
pH da massa neutralizada é então aumentado para 9,5 ou mais, para
desesterificar/desacetilar 6-acetil-4,1', 6'-triclorogalactosacarose para formar 4,1',
20 6'-triclorogalactosacarose, por meio do uso de hidróxidos alcalinos de cálcio,
sódio, potássio, etc. Esta desesterificação/desacilação alcalina envolve a
exposição dos reagentes a um pH adverso, na faixa alcalina, o que leva à
destruição de uma quantidade significativa de dimetilformamida (DMF), que é uma
cara contribuição, afetando adversamente sua recuperação após a reação.

25 No processo da técnica anterior, a mistura de reação
também fica exposta durante o processo de desacilação a temperaturas
adversas, que levam à destruição do próprio produto 4, 1', 6'-
triclorogalactosacarose (TGS).

Conseqüentemente, existe a necessidade de apresentar um método de desacilação que não exponha a dimetilformamida (DMF) à destruição. Um método foi desenvolvido para a obtenção da desacilação enzimática, a um pH que não exponha a dimetilformamida (DMF) à destruição.

5

Descrição Detalhada da Invenção

A desacilação enzimática foi descrita por Palmer e outros, em 1995, na Patente Norte-Americana No. 5445951, para a preparação de derivados parcialmente acilados de sacarose, por meio da desacilação catalisada por enzimas de ésteres de sacarose a partir de um éster de sacarose selecionado do grupo que consiste em octa-acilato de sacarose, hepta-acilato de sacarose e hexa-acilato de sacarose, em um meio orgânico anidro, com uma enzima ou com uma combinação de enzimas, que possa catalisar a desacilação do dito éster de sacarose, para produzir um derivado de sacarose parcialmente desacilado, tendo grupo(s) hidroxila livre na(s) posição/posições pré-selecionada(s), e recuperar o derivado de sacarose parcialmente desacilado resultante.

15

Não há conhecimento de outro relatório a respeito da desacilação enzimática de um éster de sacarose ou de seus derivados/precursores.

A presente invenção se refere à desacilação enzimática de TGS 6-O-protegido obtido após a reação de cloração durante a preparação do adoçante artificial, TGS. As modalidades da mistura da reação de cloração que pode ser submetida ao processo descrito na presente invenção incluem, mas não ficam limitadas a um fluxo de tratamento obtido após a mistura de sacarose-6-éster com um agente de cloração, conforme descrito por Mufti e outros, em 1983, na Patente Norte-Americana No. 4.380.476, por Walkup e outros, em 1990, na Patente Norte-Americana No. 4.980.463, por Jenner e outros, em 1982, na Patente Norte-Americana No. 4.362.869, por Tulley e outros, em 1989, na Patente Norte-Americana No. 4.801.700, por Rathbone e outros, em 1989, na Patente Norte-Americana No. 4.826.962, por Bornemann e outros, em 1992, na Patente Norte-Americana No. 5.141.860, por Navia e outros, em 1996, na Patente Norte-

20
25
30

Americana No. 5.498.709, por Simpson, em 1989, na Patente Norte-Americana No. 4.889.928, por Navia, em 1990, na Patente Norte-Americana No. 4.950.746, por Neiditch e outros, em 1991, na Patente Norte-Americana No. 5.023.329, por Walkup e outros, em 1992, 5.089.608, por Dordick e outros, em 1992, na Patente
5 Norte-Americana No. 5.128.248, por Khan e outros, em 1995, na Patente Norte-Americana No. 5.440.026, por Palmer e outros, em 1995, na Patente Norte-Americana No. 5.445.951, por Sankey e outros, em 1995, na Patente Norte-Americana No. 5.449.772, por Sankey e outros, em 1995, na Patente Norte-Americana No. 5.470.969, por Navia e outros, em 1996, na Patente Norte-
10 Americana No. 5.498.709, por Navia e outros, em 1996 e na Patente Norte-Americana No. 5.530.106. A desacilação enzimática é realizada no fluxo de tratamento obtido conforme mencionado acima, após a neutralização da massa da reação clorada, após ou sem o isolamento intermediário do TGS 6-O-
protegido. O solvente, a amida terciária presente na massa da reação
15 neutralizada, não se decompõe devido à reação enzimática e, portanto, resulta na recuperação melhorada do dito solvente.

Na presente invenção, a massa da reação clorada, após a reação de cloração, é neutralizada com uma base apropriada. Quando o pH é controlado durante a neutralização abaixo de 6,0, o complexo TGS formado ainda
20 tem o grupo protegido intacto na 6^a posição. O desagrupamento da 6^a posição é realizado com ou sem isolamento do dito composto. Outras várias referências também apontam que o desagrupamento pode ser efetuado com ou sem amida terciária, bem como outros solventes e condições aquosas.

A presente invenção descreve a desacilação na 6^a
25 posição por meio do uso de um processo enzimático, no qual a enzima remove, seletivamente, o grupo protegido na presença ou na ausência da amida terciária, incluindo dimetilformamida (DMF), que é utilizada na reação de cloração.

O processo da presente invenção também funciona bem para a desacilação de modalidades que não são resultantes de uma reação de
30 cloração, como, por exemplo, uma solução simples de TGS-6-éster puro.

A desacilação catalisada por enzima é bastante conhecida e as enzimas proteolíticas e as enzimas lípases realizam as reações de desacilação e acilação sob condições benignas de reação e é amplamente divulgado por Soedjak HS, Spradlin JE (1994). *Biocatalysis* 11: 241-248; Therisod M. Klibanov AM (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108: 5638- 5640; B. Cambou e A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. SOC.*, 106, 2687(1984); Kirpal S Bisht, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 68, No. 3, pp. 749-752, 1996; F.J. Plou¹; M.A. Cruces¹, *Biotechnology Letters* 21: 635-639, 1999. Na presente invenção, após a neutralização da massa de reação, o pH é ajustado a 6,5, por meio do uso de uma base apropriada. A enzima lípase é então lentamente adicionada à massa de reação sob agitação, à temperatura ambiente. A quantidade de enzima adicionada à massa de reação varia entre 10% e 40% em peso/volume, dependendo das condições da reação e da atividade enzimática. O teor de amida terciária na massa de reação neutralizada varia entre aproximadamente 10% e 40%. A mistura de reação é agitada continuamente por um período de 10 a 60 horas, de preferência, entre 16 e 20 horas. A conversão de TGS 6-O-protegido em TGS é monitorada por cromatografia em camada delgada (TLC). Após a completa desacilação, a mistura de reação é levada para o isolamento do TGS, por meio de cromatografia de afinidade. O TGS isolado é então cristalizado por meio do uso de métodos apropriados.

O uso de enzimas lípases ou enzimas proteolíticas, para a desacilação de TGS 6-O-protegido em TGS, pode ser na sua forma nativa ou na forma imobilizada. Quando a enzima imobilizada é utilizada, a enzima é filtrada após o término da desacilação. Esta enzima recuperada também pode ser reutilizada. Além disso, a enzima imobilizada também pode ser empacotada em uma coluna e a massa de reação pode ser passada através da coluna e a desacilação *in situ* do TGS 6-O-protegido pode ser realizada. Estas enzimas podem ser imobilizadas em ou sobre suportes poliméricos sintéticos que incluem, por exemplo, mas não ficam limitados a suportes a base de náilon, poliacrílico, poliestireno ou poliacrilamida; ou suportes orgânicos naturais ou semi-sintéticos, como, por exemplo, aqueles baseados em polissacarídeos, que incluem, por

exemplo, mas não ficam limitados a celulose, amido, dextrano, agár-agár, quitosana, quitina, etc; ou suportes inorgânicos, como, por exemplo, aqueles baseados em carbono, sílica, zircônia, alumina, fosfato de zircônio, etc.

5 A fonte das enzimas lípases pode ser de origem animal, vegetal ou microbiana, de preferência, de origem microbiana ou bacteriana, como, por exemplo, *Bacillus thermocatenuatusis*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc., de origem fúngica, como, por exemplo, *Penicillium Roquefortii*, *Asperigillus niger*, *Asperigillus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miheii*, *Candida antartctica*, etc.

10 Durante o processo da presente invenção, o TGS produto não fica exposto a quaisquer condições adversas de temperatura ou pH, tal como no caso dos processos convencionais de desacilação, por meio do uso de ácido e álcali. A perda de produto é mínima comparada com qualquer outra forma de processo de desacilação.

15 Durante o processo da presente invenção, a amida terciária não fica exposta a quaisquer condições adversas de temperatura ou pH, tal como no caso dos processos convencionais de desacilação, por meio do uso de ácido e álcali. Conseqüentemente, de forma alguma ocorre a decomposição da amida terciária. Portanto, o rendimento da recuperação da amida terciária
20 aumenta significativamente.

Abaixo, são descritos exemplos que ilustram o funcionamento da presente invenção, sem limitar, de qualquer maneira, o âmbito da mesma. Os reagentes, a proporção dos reagentes utilizados, a variedade das condições de reação descritas, as enzimas utilizadas e algo do gênero são
25 apresentados apenas a título de ilustração e o âmbito da presente invenção engloba seus reagentes análogos e condições de reação análogas, bem como reações de natureza genérica análoga. Em geral, qualquer alternativa equivalente, que seja evidente para os especialistas versados na técnica de produção de sacarose clorada, será incluída no âmbito do presente relatório
30 descritivo. Conseqüentemente, a citação de um acetato abrangerá qualquer grupo

éster equivalente que possa desempenhar a mesma função no contexto da presente invenção, e a utilização de uma enzima abrangerá qualquer alternativa que possa fornecer a ação ou a ação análoga da enzima aqui descrita sob condições análogas de reação. Várias outras adaptações das modalidades serão facilmente previsíveis por aqueles especialistas versados nesta técnica e que também estão incluídas no âmbito do presente relatório descritivo. Uma citação na forma singular pretende também incluir o seu plural, a menos que o contexto não permita isso, ou seja: a utilização da expressão "um solvente orgânico" para extração abrange a utilização de um ou mais de um solvente orgânico, seja sucessivamente ou em combinação, como uma mistura.

EXEMPLO 1

Cloração de sacarose-6-acetato

Em um frasco de reação de 5 litros, 1250 ml de dimetilformamida (DMF) foram adicionados e resfriados a uma temperatura entre 0°C e 5°C. Depois disso, foram adicionados, lentamente, 635g de pentacloreto de fósforo (5,4 moles), sob agitação, mantendo-se a temperatura da massa de reação inferior a 30°C. A massa também foi resfriada a uma temperatura inferior a 0°C e a sacarose-6-acetato em dimetilformamida (DMF) foi lentamente adicionada, a uma temperatura entre 0°C e 5°C. Em seguida, a massa de reação foi aquecida a uma temperatura de 80°C e mantida por um período de uma hora, e depois também foi aquecida a uma temperatura de 100°C e mantida por um período de 6 horas e, finalmente, foi aquecida a uma temperatura entre 110°C e 115°C e mantida por um período entre 2 e 3 horas. O progresso da reação foi controlado por análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Depois disso, a mistura de reação foi resfriada a uma temperatura entre -5°C e -8°C e uma solução de hidróxido de sódio 20% foi adicionada lentamente, de modo a levar o pH da massa entre 5,5 e 6,5. O rendimento obtido por este método foi de 55,4% de teor de sacarose.

EXEMPLO 2

Desacetilação enzimática de 6-O-acetil-TGS por enzimas lípases

A massa de reação, 1,5 litro, contendo 15g de TGS 6-O-acetilado preparado conforme descrição no Exemplo 1, foi neutralizada por meio do uso de uma pasta de hidróxido de cálcio 50% até atingir o pH 7,5. A massa de reação neutralizada foi diluída a 6 litros, por meio do uso de água. O teor de dimetilformamida (DMF) foi de 33% na massa neutralizada. Foram isolados 84g de enzima lípase de *Aspergillus oryzae* ATCC 26850; acrescentou-se NCIM 1212 à mistura de reação sob agitação contínua, à temperatura ambiente. A reação foi continuada durante várias horas e a formação de TGS e o desaparecimento de TGS 6-O-acetilado foram monitorados por cromatografia em camada delgada (TLC). Ao final de 42 horas, obteve-se a desacetilação de até 98,4%.

Após a desacetilação, a massa foi levada para o isolamento de TGS, por meio de métodos apropriados.

EXEMPLO 3

Desacetilação enzimática de 6-O-acetil-TGS por enzimas lípases imobilizadas em Eudragit RL100

Em um experimento, 2,5 litros da massa de reação contendo 80g de TGS 6-O-acetilado foram neutralizados por meio do uso de uma pasta de hidróxido de cálcio 50% até atingir o pH 7,5. A massa de reação neutralizada foi diluída a 6 litros por meio do uso de água. O teor de dimetilformamida (DMF) foi de 33% na massa neutralizada. Foram adicionados à mistura de reação, 120g de enzimas lípases imobilizadas em Eudragit RL100 sob agitação contínua a uma temperatura entre 25°C e 30°C, que normalmente é a temperatura ambiente. A reação foi continuada durante várias horas e a formação de TGS e o desaparecimento de TGS 6-O-acetilado foram monitorados

por cromatografia em camada delgada (TLC). Ao final de 24 horas, obteve-se a desacetilação de até 98,3%.

A massa foi então filtrada e levada para o isolamento de TGS. A enzima obtida na torta de filtro foi lavada com água e armazenada para ser reutilizada.

EXEMPLO 4

Desacetilação enzimática de 6-O-acetil-TGS por enzimas lípases imobilizadas em Eudragit RL 100 empacotadas em uma coluna

Em um experimento, 12g de enzimas imobilizadas foram empacotados em uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro e 8 cm de altura. A entrada da coluna foi conectada ao ponto de distribuição de uma bomba peristáltica e a saída foi conectada a um frasco contendo 500 ml de massa neutralizada, que continha 5 g de 6-O-acetil. A entrada da bomba peristáltica também foi conectada à massa neutralizada. A massa neutralizada foi circulada a uma taxa de fluxo de 5 ml/minuto, através do leito de lípase imobilizada, durante 6 horas.

A cromatografia em camada delgada (TLC) foi realizada a cada hora para ver o grau de desacetilação ocorrendo no frasco. Após 6 horas, foi observada uma desacetilação superior a 98%.

Após o término da desacetilação de 6-O-acetil-TGS em TGS, o leito da enzima imobilizada foi lavado com água deionizada e foi armazenada em acetona 10% em água, até nova utilização.

EXEMPLO 5

Desacetilação enzimática de 6-O-acetil-TGS pela enzima alcalase, uma enzima proteolítica

Foi recolhido 1,0 L de massa neutralizada após cloração, contendo 10g de TGS 6-O-acetilado para a reação enzimática. A massa de reação neutralizada foi diluída a 3 litros por meio do uso de água. Foram adicionados 200 ml de Alcalase 2,4L, uma enzima comercialmente obtida junto à

5 Novozymes, derivada de *B. lichenformis*, à mistura de reação, sob agitação contínua, a uma temperatura entre 25°C e 30°C. A reação foi continuada durante várias horas e a formação de TGS e o desaparecimento de TGS 6-O-acetilado foram monitorados por cromatografia em camada delgada (TLC). Ao final de 36

10 horas, obteve-se a desacilação de até 96,4%. Após a desacilação, a massa foi levada para o isolamento de TGS, por meio de métodos apropriados.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO DE SACAROSE CLORADA, caracterizado pelo fato de, no dito processo, um derivado clorado de uma sacarose 6-O-protegida em uma solução ser desprotegido por meio do uso da ação de uma enzima capaz de remover o grupo de proteção.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO DE SACAROSE CLORADA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de:

- a. a dita sacarose 6-O-protegida compreender um ou mais entre: sacarose-6-acetato, sacarose-6-benzoato, sacarose-6-propionato, sacarose-6-laurato, sacarose-6-glutarato, sacarose-6-palmitato e algo do gênero;
- b. a dita solução incluir uma solução de sacarose 6-O-protegida clorada pura, ou (ii) um fluxo de tratamento obtido em um processo de produção de um composto de sacarose clorada.

3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO DE SACAROSE CLORADA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de:

- a. o dito fluxo de tratamento compreender um ou mais de um processo para a produção de uma sacarose clorada, incluindo um processo de cloração da sacarose ou um processo de cloração da sacarose 6-O-protegida, e;
- b. o dito composto de sacarose clorada incluir uma ou mais de uma sacarose clorada, incluindo uma triclorogalactosacarose, uma diclorogalactosacarose, uma tetraclorogalactosacarose ou algo do gênero.

4. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO DE SACAROSE CLORADA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de o dito processo de cloração compreender a reação de um derivado de sacarose com um mais de um reagente de cloração, por meio de um ou mais de um processo, incluindo:

- a. a reação da sacarose 6-O-protegida dissolvida em piridina com cloreto de sulfurila, ou;

b. a reação da sacarose 6-O-protegida com cloreto de tionila, na presença de fosfina de trifenila e 1,1,2-tricloroetano, ou;

c. a reação da sacarose 6-O-protegida, incluindo sacarose-6-éster, com um reagente Vilsmeier-Haack, cuja fórmula geral é
5 [HCIC=N⁺R₂]Cl⁻ ou [HPOCl₂OC⁺=N⁺R₂]Cl⁻, sendo que R representa um grupo alquila, de preferência, um grupo etila ou um grupo metila.

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO DE SACAROSE CLORADA, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de, no dito processo, a ação de uma enzima capaz de remover o grupo de
10 proteção ser derivada de uma enzima lipase ou de uma enzima protease.

6. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO DE SACAROSE CLORADA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de a dita enzima lipase ou a dita enzima protease ser uma enzima livre ou imobilizada.

7. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM COMPOSTO DE SACAROSE CLORADA, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a. clorar a sacarose-6-acetato contida em (i) uma solução ou (ii) um fluxo de tratamento obtido em um processo de produção de sacarose
20 clorada com um reagente de cloração selecionado do grupo que consiste em um reagente Vilsmeier-Haack, cloreto de sulfurila ou cloreto de tionila;

b. ajustar o pH do fluxo de tratamento da etapa (a) da presente reivindicação entre aproximadamente 6,5 e 7,0;

c. desacilar o TGS 6-O-protegido formado no fluxo de
25 tratamento da etapa (i) ou da etapa (ii), colocando o mesmo em contato com a enzima lipase livre ou imobilizada ou com a enzima protease livre ou imobilizada, de preferência, acompanhado de agitação em um recipiente de reação ou de recirculação, através de um leito de enzima empacotada em uma coluna, de preferência, à temperatura ambiente, entre aproximadamente 25 e 30 graus
30 Celsius, durante um período de tempo suficiente, para a obtenção da máxima desacilação possível, superior a 95%;

d. separar o TGS de um ou mais de um componente indesejado do fluxo de tratamento da etapa (c) da presente reivindicação.

RESUMO

“PROCESSO DE DESACILAÇÃO CATALISADA POR ENZIMAS DE DERIVADOS CLORADOS DE AÇÚCAR”, que consiste em um processo para a produção de triclorogalactosacarose, no qual a desacilação de 5 sacarose-6-éster é obtida ao submeter a mistura de reação, após a cloração, a neutralização e o ajuste do pH entre 6,5 e 7, à desacilação, por meio do uso de uma enzima lípase ou de uma enzima protease, de uma forma livre ou imobilizada.