

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

(21) **PI0611316-8 A2**

(22) Data de Depósito: 26/05/2006
(43) Data da Publicação: 31/08/2010
(RPI 2069)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/685
A61K 8/14
A61K 47/48
A23J 7/00
C07F 9/10
C12P 9/00

(54) Título: **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE FOSFATÍDEOS, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E RESPECTIVOS USOS**

(30) Prioridade Unionista: 01/08/2005 US 60/703,870,
30/05/2005 IT PD2005 A 000164

(73) Titular(es): Fidia Farmaceutici S.P.A.

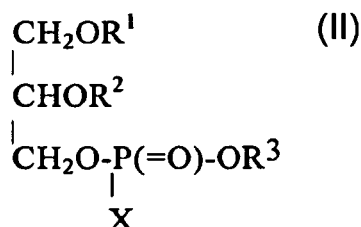
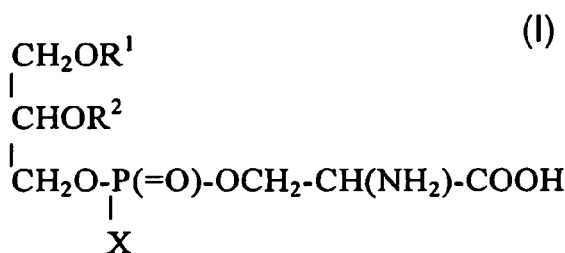
(72) Inventor(es): Anna Maria Zanellato, Antonio Gambillara, Mara Pittarello, Susanna Vaccaro

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006005030 de 26/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/128639 de 07/12/2006

(57) Resumo: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE FOSFATÍDEOS, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E RESPECTIVOS USOS. A presente invenção refere-se ao processo para a preparação de fosfatidilserina de fórmula $\text{CH}_2\text{OR}^1 \text{CHOR}^2 \text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ X em que R¹ e R² independentemente uma acila C10-C30 saturada, monoinsaturada ou poliinsaturada, X = OH ou OM onde M = metal alcalino ou alcalino terroso, amônio, alquilamônio (incluindo o sal interno) incluindo a reação de transfosfatidilação entre fosfatidilcolina da fórmula geral $\text{CH}_2\text{OR}^1 \text{CHOR}^2 \text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})-\text{OR}^3$ X em que R¹ e R² e X possuem os significados especificados acima, R³ = $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ou $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ e Serina na forma D, L ou racêmica catalisada pela enzima fosfolipase D (PLD), caracterizado pelo fato de que dita reação é realizada em um meio hidroalcolico contendo um álcool alifático e na presença de óxido de metal bivalente.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE FOSFATÍDEOS, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E RESPECTIVOS USOS".

Objeto da Invenção

5 A presente invenção refere-se aos processos para a produção e purificação de fosfatidilserina (PS), para obter o produto final com rendimento elevado por meio de óxidos de metal bivalentes (BMO).

Campo da Invenção

10 O declínio funcional do Sistema Nervoso Central (CNS) que ocorre durante o processo fisiológico do envelhecimento cerebral frequentemente causa deterioração das funções cognitivas no idoso que pode por sua vez causar distúrbios e alterações de comportamento da memória temporal e espacial.

15 Este declínio funcional na atividade do CNS é ligado com o começo das alterações tanto bioquímicas quanto estruturais na composição de lipídeo das membranas neuronais e atividade reduzida das enzimas cerebrais que podem reduzir as sinapses neuronais.

20 A fosfatidilserina (PS) é o principal fosfolipídeo ácido no cérebro. A pesquisa científica tem portanto sido focalizada durante algum tempo na descoberta de um tratamento farmacológico para os distúrbios cognitivos relacionados com a idade, com base nos fosfolipídeos que podem prevenir (e/ou parcialmente reconstruir) o déficit estrutural e funcional das que envelhecem as membranas neuronais.

25 Estudos pré-clínicos e clínicos em seres humanos demonstraram que a administração de PS oralmente pode, especialmente no idoso, determinar um aumento significativo na capacidade de aprendizado e na memória temporal e espacial, mesmo no caso de patologias particularmente incapacitantes tais como a doenças de Alzheimer (Cenacchi T. et al.; Aging Clin Exp Res; 1993; 5:123-133; Nunzi MG et al.; Adv Exp Med Biol; 1992; 30 318:393-8).

Além do mais, foi demonstrado que a fosfatidilserina é capaz de combater o aumento no hormônio cortisol em indivíduos que sofrem de estresse físico (Monteleone P. et al.; Neuroendocrinology; 1990; 52(3):243-8),

desse modo reduzindo o catabolismo da glicose, com maior recuperação funcional após esforço físico intenso.

A presente invenção se refere a um processo para a síntese e purificação de PS e ao uso de PS como o princípio ativo nos fármacos (e/ou suplementos alimentícios) para a prevenção das patologias relacionadas com a idade supracitadas, e na preparação de suplementos alimentícios indicados para todos os casos de estresse físico intenso e, além disso, na produção de lipossomas para uso no campo de cosméticos e/ou como um sistema de liberação controlada para os fármacos que eles contêm.

Os processos para a produção e purificação de PS anteriormente conhecidos da literatura científica e patentes descrevem a conversão enzimática de fosfatidilcolina (PC) em PS por uma reação de transfosfatidilação catalisada pela enzima fosfolipase D (PLD), com purificação subsequente efetuada principalmente pela extração da PS com solventes orgânicos.

Nos últimos anos, vários processos foram aperfeiçoados para a sintetização de PS mediante a conversão enzimática em sistemas de duas fases de solvente água/orgânico ou em um meio aquoso.

A EP 0776976 descreve um processo para a preparação enzimática de PS em um sistema consistindo em água/tolueno em que a fase orgânica contém o fosfolípido de partida do qual a PS é formada, a fase aquosa contém o aceitante de hidróxi e a reação de síntese ocorre na interface água/solvente na presença de fosfolipase D bruta a partir dos caldos de fermentação de cepas de microorganismos que produzem PLD.

Pela primeira vez, em 1990, os pesquisadores tentaram evitar o sistema de duas fases por que ele requeria grandes quantidades de solvente que era depois difícil para se eliminar, conseqüentemente com custos elevados para a produção e purificação da PS (Comfurius P. et al., Journal of Lipid Research 1990, 31:1719-1721).

O solvente orgânico foi portanto substituído por um detergente/tensoativo capaz de dispersar o fosfolípido de partida na forma de micela a fim de efetuar a reação enzimática da síntese exclusivamente em um meio aquoso.

De fato, a EP 1048738 se refere a um processo para a síntese enzimática da PS em um meio aquoso absolutamente livre de qualquer contaminação por solventes orgânicos, na presença de dadas concentrações de detergentes específicos e sais de cálcio.

5 A DE 19917249 descreve um método para a produção enzimática de PS em um meio aquoso sem usar tensoativos, exclusivamente com a adição de sal de cloreto de cálcio (CaCl_2), no entanto, a porcentagem da conversão enzimática e o grau de pureza da PS obtida não são específicas.

10 A EP 1310563 descreve um processo para a preparação de PS em uma fase aquosa sem usar detergentes e/ou sais de cálcio, com base na homogeneização da mistura de partida consistindo em fosfolípídeo, aceitante de hidróxi e PLD em água, para fornecer um homogeneizado final com uma estrutura similar àquela de uma membrana de fosfolípídeo bilamelar em que a reação de transfosfatidilação pode subsequente ocorrer.

15 A EP 1427839 descreve a síntese enzimática de fosfolípídeos, incluindo a PS, em água, sem detergentes, mas na presença de íons de metal que são liberados dos sais correspondentes quando eles forem preparados/dissolvidos em água. Dito processo ocorre em duas fases distintas em que, partindo das misturas de fosfolípídeos, uma primeira reação de hidrólise enzimática é catalisada por PLD para produzir ácido fosfatídico, seguido
20 por uma segunda reação de transfosfatidilação em que a PS é formada na presença de um excesso de serina.

 Por último, a EP 12312134 reivindica um processo para a síntese enzimática de PS usando, em água, uma fração da enzima PLD produzida e purificada a partir da cepa de *Streptoverticillium hachijoense* para uma
25 produção mais abundante na produção final de PS.

 Com referência à purificação de PS (obtida por transfosfatidilação em um meio aquoso/solvente orgânico ou em um meio aquoso), a EP 1213294 reivindica um processo de purificação com base no uso de uma
30 mistura consistindo em água/solvente orgânico polar (tal como isopropanol) para extrair o fosfolípídeo acima mencionado da solução que o contém, que é por sua vez representada por um solvente de hidrocarboneto (tal como

tolueno), enquanto a EP 0922707 se refere a um processo para a extração/purificação de PS a partir de uma mistura de fosfolípídeos usando um sistema difásico de solventes orgânicos tais como heptano e metanol.

5 A presente invenção refere-se aos processos para a produção e purificação de fosfatidilserina (PS) que proporciona o produto final em um rendimento muito elevado graças a uma conversão eficiente de PC em PS pela ação específica de Óxidos de Metal Bivalentes (BMO).

Além do mais, o processo de transfosfatidilação catalisada pela enzima PLD, permite uma porcentagem elevado de PC ser convertida em
10 PS independente do meio em que a reação enzimática ocorre.

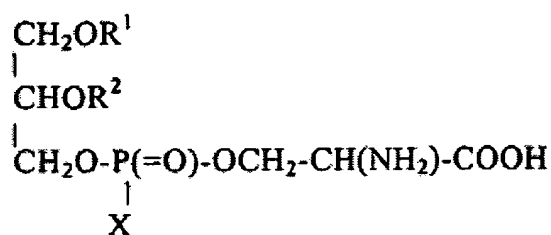
Portanto, a presente invenção se refere a um processo para a produção de PS catalisada por PLD e BMO, cujo processo é caracterizado pelo fato de que é realizado
em um meio hidroalcoólico consistindo em água/álcoois alifáticos, ou
15 em um meio aprótico consistindo em água/solventes apróticos polares, ou em um sistema de duas fases consistindo em água/solventes orgânicos.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção se refere a um processo para a preparação de PS (fórmula I), em que uma transfosfatidilação é realizada pela enzima
20 PLD, na presença de BMO, desse modo conseguindo a transferência de um componente de fosfatidila da fosfatidilcolina (PC) (fórmula II) para serina (que neste caso representa o aceitante de hidróxi); esta reação enzimática fornece a conversão de PC em PS em um grau muito elevado, independente do meio em que a reação enzimática ocorre. Dita reação pode portanto
25 ocorrer:

- em um meio hidroalcoólico consistindo em água/álcoois alifáticos que não formam um sistema de duas fases, ou
- em um meio aprótico consistindo em água/solventes apróticos polares que não formam um sistema de duas fases, ou
- 30 • em um sistema de duas fases consistindo em água/solventes orgânicos.

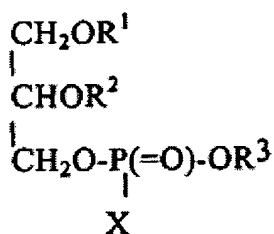
Fórmula I



em que R^1 e R^2 independentemente representam uma acila $\text{C}_{10}\text{-C}_{30}$ saturada, monoinsaturada e/ou poliinsaturada, $\text{X} = \text{OH}$ ou OM onde $\text{M} =$ metal alcalino ou alcalino terroso, amônio, alquilamônio (incluindo o sal interno).

5

Fórmula II



em que R^1 e R^2 e X significam como definido acima e $\text{R}^3 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ou $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Foi surpreendentemente observado que o BMO drasticamente modifica o substrato de reação representado pela fosfatidilcolina de partida que determina uma mudança tal que a ação da enzima PLD significativamente aumenta em termos de rendimento final em PS, assim permitindo uma produção de PS em uma escala industrial. Esta mudança substancial ocorre na estrutura do próprio substrato, independente do meio em que a reação enzimática ocorre. De fato, o BMO favorece a fissuração das vesículas de PC e, desse modo, a penetração da enzima nele, determinando um aumento na porcentagem de conversão de PC em PS visto que, mediante a penetração dentro das vesículas, a enzima PLD pode também atuar sobre a camada de lipídeo dentro da vesícula, que não pode anteriormente ser penetrado por soluções hidrófilas tais como aquelas que contêm a enzima em si.

20

De acordo com a invenção, vários óxidos de metal bivalentes foram testados, tais como óxido de cálcio (CaO), óxido de magnésio (MgO) e óxido de zinco (ZnO), em meio tanto hidroalcoólico quanto aprótico, assim

como em sistemas de duas fases em que eles deram excelentes resultados, como mostrado nos Exemplos que seguem, comparados com os resultados obtidos por meio dos mesmos processos, mas na presença de cloreto de cálcio (CaCl_2).

5 De fato, é sabido que os sais de cálcio, e em particular CaCl_2 , como fontes de íons de cálcio adicionados ao meio em que a reação de transfosfatidilação ocorre (Comfurius P. et al., Journal Acta, Research 1990, 31:1719-1721; Comfurius P. et al., Biochim Biophys Acta, 1977, 488:36-42), promovem a atividade catalítica da enzima PLD e desse modo aumentam a
10 conversão de fosfatidilcolina em PS (Okawa Y. et al.; J. Biochem.; 1975;78:363-372).

De modo a diferenciar e clarificar que os BMOs são completamente diferentes dos sais de metal e para demonstrar a sua eficácia nos novos sistemas de produção que são o objeto da presente invenção, a Re-
15 querente executou experiências que comparam os diferentes rendimentos da conversão de PC em PS na presença de sais de cálcio e na presença de BMO.

Como pode ser visto dos resultados obtidos, o rendimento da conversão de fosfatidilcolina em PS consistentemente comprovou ser não
20 apenas muito diferente, mas também decidida e significativamente mais elevado do que aquele obtido com CaCl_2 .

Além dos óxidos descritos acima, vários BMO diferentes podem ser utilizados no novo processo para a produção de PS, tais como óxido de manganês, óxido de ferro bivalente, óxido de cobalto, óxido de cobre e to-
25 dos os óxidos de metal bivalentes remanescentes na Tabela dos Elementos.

Exemplo de solventes em que o processo da presente invenção pode ser realizado são álcoois alifáticos, tais como metila, etila, n-propila, isopropanóis; solventes apróticos, tais como dimetilsulfóxido (DMSO), dime-
30 tilformamida, acetonitrila, N-metil-pirrolidona; e solventes orgânicos, tais como n-hexano, tolueno, n-butanol, benzeno.

O álcool preferido é isopropanol, o solvente aprótico preferido é DMSO e o solvente orgânico preferido é hexano.

O Exemplo 1 descreve a conversão de PC em PS partindo de meio hidroalcoólico de partida contendo as porcentagens dadas de isopropanol adicionado a uma solução de partida consistindo em tampão de acetato em que o CaO (ou MgO ou ZnO) foi dissolvido, comparado com o processo de produção de PS executado no mesmo meio hidroalcoólico, mas na presença de sal de CaCl_2 .

A porcentagem de álcool (isopropanol em particular) que pode ser usado no presente processo (expresso como % em volume sobre o volume do tampão de partida) pode variar de 0,1 a 50 %, preferivelmente de 1,25 a 20 %, e mais preferivelmente 10 %, em um meio hidroalcoólico contendo uma concentração de BMO (em particular, CaO) variando entre 0,1 e 1 M, preferivelmente entre 0,3 e 0,6 M, e mais preferivelmente igual a 0,54 M.

O rendimento máximo da conversão de PC em PS é de 90 %, que é removido do rendimento obtido pelo mesmo processo de produção, mas na presença de CaCl_2 .

O Exemplo 2, por outro lado, demonstra que é possível obter rendimentos ainda mais elevados do que 80 % da conversão de PC/PS, mediante a adição das quantidades dadas de DMSO (expressas como % em volume sobre o volume de tampão usado) na solução de tampão de partida contendo as concentrações molares dadas de CaO (ou MgO ou ZnO), e que os rendimentos supracitados de PS são muito diferentes daqueles obtidos pelo mesmo processo de produção, mas na presença de CaCl_2 .

A porcentagem de solvente aprótico (e DMSO em particular) a se usada pode variar de 0,1 a 50 %, preferivelmente de 1,25 a 10 %, e mais preferivelmente ser de 1,25 %, em um meio aprótico contendo uma concentração de BMO (CaO em particular) variando entre 0,1 e 1 M, preferivelmente entre 0,3 e 0,6 M, e ainda mais preferivelmente, pode ser igual a 0,33 M.

A reação enzimática da transfosfatidilação fornece um rendimento muito elevado de conversão de PC/PS, mesmo em um sistema de duas fases consistindo em água/solvente orgânico.

O Exemplo 3 descreve a produção de PS em um sistema de

duas fases consistindo em água/hexano, novamente na presença de CaO, MgO e ZnO. A quantidade de solvente usada nos novos processos que são o objeto da presente invenção é muito baixa (como demonstrado mais adiante), tão baixa que os custos de produção são limitados e não é difícil eliminar o solvente do produto final.

A concentração de solvente a ser usada em dito processo pode variar de 0,1 a 40 % v/v (expressa como % em volume sobre o volume do tampão de partida), preferivelmente de 1 a 5 % v/v, e mais preferivelmente 1,25 % v/v e 2,5 % v/v, na presença de BMO (e CaO em particular) em uma concentração variando entre 0,1 e 1 M, preferivelmente entre 0,3 e 0,6 M e mais preferivelmente igual a 0,54 M.

Neste caso também o rendimento máximo da conversão de PC em PS era mais de 80 %, muito diferente daquele obtido pelo mesmo processo, mas na presença de CaCl_2 .

A reação de transfosfatidilação pode ser conduzida em diferentes temperaturas, variando entre 20 e 70 °C, preferivelmente em 45 ou 55°C.

O substrato de fosfatídeo de partida é representado pela fosfatidilcolina de origem animal e/ou vegetal, natural ou sintética, presente na forma purificada ou como a matéria prima, em concentrações de partida variando entre 10 e 500 mg/ml, preferivelmente entre 200 e 300 mg/ml.

O meio aquoso de partida a ser misturado/associado com o álcool, o solvente aprótico ou o solvente orgânico para obter um meio final hidroalcoólico, aprótico ou de duas fases, é representado por água ou uma solução de salina não tamponada ou uma solução tamponada formada, por exemplo, por acetato triidrato de sódio e ácido acético em concentrações entre 0,02 e 0,2M.

O aceitante de hidroxila é representado por serina, que pode estar presente na forma D, L ou racêmica. A concentração ideal de serina, preferivelmente na forma L, pode variar entre 1 g/g (gg) de fosfatídeo de partida, até 5 gg, preferivelmente entre 2 e 3 gg/gg de fosfatídeo.

O pH ideal da solução tampão pode variar entre 4 e 9 porque depende da origem da PLD usada, preferivelmente entre 5 e 6, e mais pre-

ferivelmente igual a 5,6 se uma PLD de origem fermentativa derivada do microorganismo *Streptovercillium hachijoense* for usada.

Dita enzima pode ser usada na forma purificada ou parcialmente purificada, ou em uma forma não purificada após a filtração do microorga-
5 nosmo de seu caldo de cultura.

O Exemplo 4 (e Figura 1) descreve um novo sistema para a purificação parcial de PLD para obter uma enzima que não é substancialmente contaminada por proteínas de uma natureza diferente que possa interferir com a atividade catalítica de PLD, um processo que não envolve igualmente
10 muitas etapas, visto que os processos prolongados resultam em custos industriais excessivos e uma conseqüente falta de praticabilidade em uma escala industrial.

A enzima parcialmente purificada descrita no Exemplo 4 foi testada no processo de produção descrito no Exemplo 3, em comparação com
15 uma enzima presente na forma não purificada (após a eliminação simples do microorganismo produtor) e com as preparações enzimáticas altamente purificadas (obtidas usando resinas cromatográficas de troca de íon e anticorpos mono/policlonais direcionados sobre a enzima PLD, mas que podem também ser purificadas usando todos os métodos de purificação conhecidos
20 por uma pessoa versada na técnica): a porcentagem de conversão de PC/PS foi igual para todas as preparações enzimáticas testadas (purificadas, parcialmente purificadas e não purificadas).

A quantidade ideal de PLD para garantir mais de 80 % de conversão de PC em PS varia entre 1 e 100 unidades/g de fosfatídeo de partida, porque depende da origem da PLD usada. Por exemplo, quando a PLD de *Streptovercillium hachijoense* for usada, a concentração ideal varia entre
25 1 e 10 unidades/g de fosfatídeo.

Um outro objetivo da presente invenção é um processo para a separação e purificação de PS de serina, PC e PLD (que representam impu-
30 rezas) remanescentes no meio em que a reação de transfosfatidilação ocorre.

De modo a separar e purificar a PS, os seguintes métodos foram desenvolvidos.

1. no final da reação de transfosfatidilação enzimática, a PS é separada pela adição de uma solução de cloreto de sódio, em uma concentração entre 2 e 6 % (preferivelmente 5 %), ao meio de reação em que o fosfolípídeo recentemente produzido está presente: duas fases assim serão
5 obtidas porque a PS permanece insolúvel nesta solução enquanto os componentes do resíduo (que são mais solúveis) principalmente permanecem no subnadante. A PS, que foi depositada na parte superior do meio de reação, é depois isolado pela separação e eliminação do subnadante.

Alternativamente, é possível começar um novo processo de separação e purificação de PS, objetivo da presente invenção, mediante a filtração do recipiente de PS no meio de reação para eliminar imediatamente
10 todos os seus componentes residuais. Uma solução de NaCl é depois adicionada. Duas fases se formam e o sobrenadante é eliminado porque a PS é encontrada no subnadante. As lavagens de NaCl podem ser repetidas duas
15 vezes ou mais, ajustando a concentração de sal se necessário. Estes procedimentos de lavagem permitem a eliminação completa dos álcoois, solventes apróticos e orgânicos usados nos processos para produzir PS descritos acima, como demonstrado no Exemplo 5. Subseqüentemente, após o tratamento dos íons presentes no meio de reação com um agente de
20 quelação, o produto é precipitado/lavado com uma solução de etanol (em uma porcentagem entre 50 e 100 %, preferivelmente 95 %), ou com uma mistura de solventes de cetona (tais como acetona) em água (em uma porcentagem entre 50 e 95 %); a lavagem com etanol pode ser repetida várias
vezes (ajustando a porcentagem de etanol presente, se necessário). Por
25 fim, uma lavagem final é executada com etanol entre 90 e 100 %, após o que o produto acabado pode ou não pode ser secado;

2. a separação e a purificação de PS são realizadas por ultrafiltração, no final da reação enzimática de transfosfatidilação, usando uma membrana porosa de tamanho de poro tal como para permitir a passagem
30 de pequenas moléculas enquanto ficam pressas aquelas grandes. Por esta razão, é preferível utilizar filtros com poros pequenos o bastante para aprisionar as moléculas com peso molecular de 100.000/300.000 Dáltons ou

mais.

Ditos procedimentos para o isolamento e purificação de PS permitem a eliminação dos resíduos das substâncias que são deixados após a reação enzimática e estavam inicialmente contidos no meio de transfosfatidilação tal como serina, PC, sais minerais, colina que é liberada de PC, PA, sais/óxidos, e, acima de tudo, permitem a purificação completa da PS da enzima PLD, nenhum traço da qual, como demonstrado no Exemplo 5, permanece. A PS final assim obtida possui um grau muito elevado de pureza.

Alguns antioxidantes tais como ácido ascórbico e/ou vitamina E podem ser incluídos no processo de preparação e purificação de PS.

A invenção é apresentada com maiores detalhes nos exemplos que seguem.

Exemplo 1

Preparação de PS a partir de PC vegetal em um meio hidroalcoólico (pela presença de isopropanol) com CaO, MgO e ZnO 0,54 M ou com CaCl₂ 0,54 M

Duas soluções hidroalcoólicas diferentes foram preparadas, formadas por duas concentrações de isopropanol (igual a 1,25 e 10 % do volume do tampão de partida) em tampão de acetato contendo CaO (ou MgO ou ZnO) 0,54 M, comparado com a preparação de PS pelo mesmo procedimento, mas na presença de sal de CaCl₂, 0,54 M.

Os óxidos testados e cloreto de cálcio são dissolvidos em 40 ml de tampão de acetato 0,2 M (pH 5,6) ao qual é depois adicionado 0,5 ml de isopropanol de modo a obter 1,25 % v/v (apenas com relação a CaO), ou 4 ml de isopropanol de modo a obter 10 % v/v (os álcoois pode também ser adicionados ao tampão contendo BMO após a solubilização da Serina).

As soluções resultantes são agitadas em um reator revestido com condensador durante cerca de 10 minutos, depois 20 g de L-serina são adicionados em uma temperatura de 55 °C, agitando até a dissolução completa. Subseqüentemente, 10 g de fosfatidilcolina de soja são adicionados e agitados durante 10 minutos. 5,5 U de enzima PLD por gg de PC são depois adicionados e a mistura é agitada durante 24 a 48 horas a 55 °C.

Finalmente, uma amostra de cada produto é tirada e a transfor-

mação bem-sucedida de PC em PS é testada pela Cromatografia de Camada Fina (TLC).

Rendimento da conversão de PC em PS:

- distribuição dos produtos presentes no final da reação, expressa
5 como % de PA (ácido fosfatídico liberado pela PC como um resultado da ação de PLD) e PS obtida seguinte ao processo de transfosfatidilação. PA e PC devem ser consideradas resíduos da reação.

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com isopropanol, 1,25 % v/v, na presença de CaO:

- 10 PA 8,0 %
PS 85,5 %
PC 6,5 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com isopropanol, 10 % v/v, na presença de CaO:

- 15 PE-OH 4,0 %
PA 3,5 %
PS 89,5 %
PC 3,0 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com isopropanol, 10 % v/v, na presença de CaCl₂:

- 20 PE-OH 15,8 %
PA 10,7 %
PS 70,1 %
PC 3,4 %

25 Rendimento da conversão de PC em PS obtida com isopropanol, 10 % v/v, na presença de MgO:

- PE-OH 9,0 %
PA 4,5 %
PS 84,0 %
30 PC 2,5 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com isopropanol, 10 % v/v, na presença de ZnO:

PE-OH 10,0 %

PA 8,0 %

PS 80,0 %

PC 2,0 %

- 5 (o produto definido como PE-OH se forma durante a reação de transfosfatidilação porque a reação ocorre na presença de álcool).

Exemplo 2

Preparação de PS a partir de PC vegetal em um meio aprótico (pela presença de DMSO) com CaO, MgO e ZnO 0,33 M ou com CaCl₂ 0,33 M

- 10 DMSO foi usado em concentrações diferentes variando entre uma porcentagem de 1,25 e 10 % em termos do volume de tampão de partida, em todos os casos na presença de CaO (ou MgO ou ZnO) 0,33 M em comparação com a preparação de PS pelo mesmo processo, mas na presença de sal de CaCl₂.

- 15 Os óxidos de cálcio testados e o cloreto de cálcio são dissolvidos em 40 ml de tampão de acetato 0,2 M, em pH 5,6. As soluções assim obtidas são agitadas em um reator revestido com condensador. Após cerca de 10 minutos de agitação, 20 g de L-serina são adicionados em uma temperatura de 45 °C e depois a agitação continuou até que a solubilização completa fosse alcançada.

- 20 Subseqüentemente, 10 g de PC de soja e 0,5 ml de DMSO (correspondendo a 1,25 % v/v) ou 4 ml de DMSO (correspondendo a 10 % v/v) são adicionados e a mistura é agitada (o DMSO pode ser adicionado durante a fase partida do processo, após a solubilização do BMO, como no Exemplo anterior). Dez minutos mais tarde, 5,5 U de enzima PLD por gg de PC são adicionados, e a mistura é agitada durante 24 a 48 horas a 45 °C.

- 25 Subseqüentemente, as amostras dos respectivos produtos obtidos são tiradas no final da reação e testadas com relação a transformação bem-sucedida de PC em PS.

- 30 Rendimento da conversão de PC em PS:

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com DMSO 1,25 % v/v na presença de CaO:

PA 7,1 %

PS 86,3 %

PC 6,6 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com DMSO 1,25

5 % v/v na presença de CaCl_2 :

PA 8,1 %

PS 66,7 %

PC 25,2 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com DMSO 10

10 % v/v na presença de CaCl_2 :

PA 6 %

PS 69 %

PC 25 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com DMSO 10

15 % v/v na presença de CaO :

PA 7,5 %

PS 72,5 %

PC 20 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com DMSO 10

20 % v/v na presença de MgO :

PA 9,0 %

PS 71,0 %

PC 20 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com DMSO 10

25 % v/v na presença de ZnO :

PA 8,5 %

PS 71,5 %

PC 20 %

Exemplo 3 a

30 Preparação de PS a partir de PC vegetal em um sistema de duas fases (pe-
la presença do solvente orgânico, hexano) com CaO , MgO e ZnO 0,54 M ou
com CaCl_2 0,54 M

Um sistema de duas fases consistindo em tampão de acetato contendo CaO (ou MgO ou ZnO) 0,54 M foi preparado, e depois uma quantidade de hexano igual a 1,25 % do volume de partida do tampão foi adicionada, comparado com a preparação de PS pelo mesmo processo de produção, mas na presença de CaCl₂, 0,54 M.

Os óxidos testados e cloreto de cálcio são depois dissolvidos em 40 ml de tampão de acetato 0,2 M (pH 5,6) a qual uma quantidade de hexano igual a 0,5 ml é depois adicionada ao tampão contendo o BMO antes ou após a solubilização da serina).

As soluções assim obtidas são agitadas em um reator revestido com condensador.

O procedimento depois continua como descrito no Exemplo 1.

Finalmente, uma amostra de cada produto obtido é tirada e testada com relação a transformação bem sucedida de PC em PS.

Rendimento da conversão de PC em PS:

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com hexano 1,25 % v/v na presença de CaO:

PA 7,5 %

PS 87,0 %

PC 5,5 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com hexano 1,25 % v/v na presença de CaCl₂:

PA 8,1 %

PS 68,4 %

PC 23,5 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com hexano 1,25 % v/v na presença de MgO:

PA 8,5 %

PS 82,5 %

PC 9,0 %

Rendimento da conversão de PC em PS obtida com hexano 1,25 % v/v na presença de ZnO:

PA 11,0 %

PS 80,0 %

PC 9,0 %

Exemplo 3 b

- 5 Preparação de PS a partir de PC vegetal em um sistema de duas fases (pe-
la presença do solvente orgânico, hexano) com CaO 0,54 M ou com CaCl₂
0,54 M

Um sistema de duas fases consistindo em tampão de acetato contendo CaO 0,54 M foi preparado e depois uma quantidade de hexano igual a 2,5 % do volume de partida do tampão foi adicionada, comparado com a preparação de PS pelo mesmo processo de produção, mas na presença de CaCl₂, 0,54 M. A partir deste ponto, o procedimento é o mesmo como no Exemplo 3 a.

Rendimento da conversão de PC em PS:

- 15 Rendimento da conversão de PC em PS obtida com hexano 2,5
% v/v na presença de CaO:
PA 7,5 %
PS 86,0 %
PC 6,5 %

- 20 Rendimento da conversão de PC em PS obtida com hexano 2,5
% v/v na presença de CaCl₂:
PA 10,0 %
PS 65,0 %
PC 25,0 %

25 Exemplo 4

Purificação parcial da enzima PLD

A enzima PLD usada no novo processo de produção pode ser parcialmente purificada pelas seguintes etapas:

- eliminação do agente de produção mediante a microfiltração de fluxo tangencial através de filtros (preferivelmente com membranas de polietersulfona: PES) com um tamanho de poro de 0,2 µm;
- ultrafiltração de fluxo tangencial através de filtros (preferivelmente em

PES) com um corte molecular de 10.000 D;

- ultrafiltração de fluxo tangencial através de filtros com membranas (preferivelmente em PES) com um corte molecular de 300.000 D;
 - ultrafiltração de fluxo tangencial final através das membranas (preferi-
- 5 velmente em PES) com um corte molecular de 10.000 D para reconcentrar a enzima e diálise contra o tampão TRIS-HCL, 50 mM pH = 8.

A Figura 1 mostra as descobertas das análises cromatográficas de enzima PLD parcialmente purificada como descrito acima, comparado com a análise de um caldo de fermentação purificado somente a partir do

10 agente que produz a própria enzima (Figura 2).

Exemplo 5 a

Separação e purificação de PS de acordo com o método 1.

O meio de reação em que a PS foi preparada é suplementado com 1,5 volume (em termos do volume de reação de partida) de uma solu-

15 ção a 5 % de NaCl, e a mistura é agitada em uma temperatura de 30 °C du-
rante pelo menos 30 minutos. A PS, que foi depositada na parte superior do
meio de reação, é depois isolada mediante a separação e eliminação do
subnadante. O sobrenadante (PS) é suplementado com 4 volumes de uma
solução a 3 % de NaCl e agitado em 30 ± 10 °C durante pelo menos 30 mi-

20 nutos. Seguinte a isto, o sobrenadante é separado e eliminado (esta etapa
foi repetida 2 vezes), enquanto ao subnadante (representado por PS) é adi-
cionado 2 volumes de uma solução de EDTA (ácido etileno diaminotetraacé-
tico) (em uma concentração de 40 gg/litro) preparada em um tampão de a-
cetato, 0,1 M pH 7,5.

25 Após outra mistura (em 25 ± 10 °C durante pelo menos 1 hora)
mediante agitação da mistura assim obtida, o pH é ajustado para 7/7,5 e 2
volumes (em termos do volume de EDTA) de 95 % etanol são adicionados,
agitando a mistura em 25 ± 10 °C durante pelo menos 1 hora.

Após um período de sedimentação da PS, ela é coletada e o

30 sobrenadante (a fase consistindo em etanol em água) é eliminada porque a
PS não se dissolverá em uma fase hidroalcoólica. A lavagem com eta-
nol/água (com uma porcentagem de etanol de 70 a 95 %) foi repetida após

o que uma lavagem final com 100 % etanol é executada, e como uma etapa final a PS pode ser secada.

Produto final: distribuição das frações de lipídeo isoladas de acordo com o método 1, com PS preparada como descrito no Exemplo 3 com

5 CaO 0,54 M.

PA 5,8 %

PS 94,2 %

Exemplo 5 b

Separação e purificação de PS de acordo com o método 1.

10 O meio de reação em que a PS foi preparada é suplementado com 1,5 volume (em termos do volume de reação de partida) de uma solução a 5 % de NaCl, e a mistura é agitada em uma temperatura de 20 °C durante pelo menos 30 minutos. A PS, que foi depositada na parte superior do meio de reação, é depois isolada mediante a separação e eliminação do

15 subnadante. O sobrenadante (PS) é suplementado com 3 volumes de uma solução a 3 % de NaCl e agitado em 20 ± 10 °C durante pelo menos 30 minutos. Seguinte a isto, o sobrenadante é separado e eliminado (esta etapa foi repetida 3 vezes), enquanto ao subnadante (representado por PS) é adicionado 3 volumes de uma solução de EDTA (em uma concentração de 30

20 gg/litro) preparada em um tampão de acetato, 0,1 M pH 7,0.

Após outra mistura (em 20 ± 10 °C durante pelo menos 1 hora) mediante agitação da mistura assim obtida, o pH é ajustado para 7/7,5 e 2 volumes (em termos do volume de EDTA) de 100 % etanol são adicionados, agitando a mistura em 20 ± 10 °C durante pelo menos 1 hora.

25 Após um período de sedimentação da PS, ela é coletada e o sobrenadante (a fase consistindo em etanol em água) é eliminada. A lavagem com etanol/água (com uma porcentagem de etanol de 70 %) foi repetida após o que uma lavagem final com 100 % etanol é executada, e como uma etapa final a PS pode ser secada.

30 Produto final: distribuição das frações de lipídeo isoladas de acordo com o método 1, com PS preparada como descrito no Exemplo 3 com CaO 0,54 M.

PA 6,8 %

PS 93,2 %

Exemplo 5 c

Separação e purificação de PS de acordo com o método 1.

- 5 Antes da adição da solução de NaCl, a PS é filtrada para eliminar imediatamente todo os componentes residuais do meio de reação. Depois NaCl é adicionado e o processo de isolamento e purificação continua como descrito no Exemplo 5 a.

- 10 Produto final: distribuição das frações de lipídeo isoladas de acordo com o método 1, com PS preparada como descrito no Exemplo 3 com CaO 0,54 M.

PA 5,0 %

PS 95,0 %

- 15 Após a reação de transfosfatidilação, análise de TLC do produto obtido (Vitello F. et al.; J Chromatog; 1978; 166(2):637-40) mostra uma concentração de 2 % de resíduo serina.

A quantidade de PDL nesta fase foi determinada pelo estado dos métodos da técnica (Aurich I. et al.; Anal Biochem; 1999; 268:337-342) e comprovou ser 2 U/g.

- 20 A concentração de serina foi medida novamente no final do processo com relação à purificação de PS descrita anteriormente e comprovada ser mais baixa do que/igual a 0,2 %.

- 25 A atividade de resíduo da enzima PLD foi também determinada novamente e comprovada estar abaixo do limite para determinação por este método.

- 30 Para demonstrar que a ausência total de até o traço menor de solvente orgânico usado no processo de preparação de PS (descrito no Exemplo 3) e assim confirmar a inovação e etapa inventiva da presente invenção, a Requerente analisou a PS parcialmente purificada descrita no Exemplo 5, na fase imediatamente precedente a adição da solução alcoólica.

A análise foi executada pela técnica conhecida de "*Gas chromatography with static head-space injection*" como descritos na European

Pharmacopoeia 5.0, section 2.4.24: Identification and control of residual solvents.

O cromatograma de calibragem (figura 3) foi obtido usando um padrão consistindo em acetato de etila e n-hexano correspondendo a 1000 ppm cada, equivalente a 100 mg de produto de teste.

A figura 4 mostra a ausência total de n-hexano na PS purificada de acordo com o Método 1.

Exemplo 6

Separação e purificação de PS de acordo com o método 2.

O meio de reação em que a PS foi preparada é suplementado com 1,5 volume (em termos do volume de reação de partida) de uma solução a 5 % de NaCl e o conjunto é agitado em uma 45 °C durante pelo menos 30 minutos, seguido por um período de separação da PS permanecendo pelo menos 1 hora.

Duas fases são formadas: elas são separadas e o subnadante é descartado, enquanto o sobrenadante é suplementado com 2,5 volumes de uma solução de EDTA 22 gg/litro, preparada em água. Assim que uma temperatura de 28 °C tenha sido alcançada, a ultrafiltração é executada. Preferivelmente, os filtros devem ser usados os quais possuem poros de um tamanho que aprisionará as moléculas com um peso molecular de 100.000/300.000 Dáltons.

O produto final pode depois ser secado por congelamento.

Produto final: distribuição das frações de lipídeo isoladas de acordo com o método 2, com PS preparada, por exemplo, de acordo com o Exemplo 1 com CaO 0,54 M.

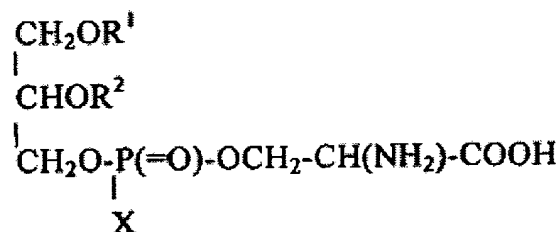
PA 6,0 %

PS 94,0 %

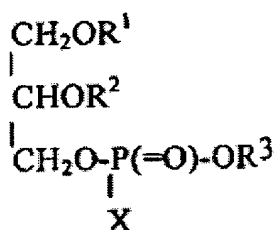
A concentração de serina foi medida no final do processo de purificação de PS anteriormente descrito e comprovada ser mais baixa do que/igual a 0,2 %, enquanto outra determinação da atividade de resíduo da enzima PLD mostrou estar abaixo do limite para determinação por este método.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de fosfatidilserina de fórmula



- em que R¹ e R² independentemente representam uma acila C₁₀-C₃₀ saturada, monoinsaturada e/ou poliinsaturada, X = OH ou OM onde M = metal alcalino ou alcalino-terroso, amônio, alquilamônio (incluindo o sal interno) incluindo a reação de transfosfatidilação entre fosfatidilcolina da fórmula geral



- em que R¹ e R² e X possuem os significados especificados acima, R³ = CH₂-CH₂-NH₂ ou CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃ e Serina na forma D, L ou racêmica catalisada pela enzima fosfolipase D (PLD),
- 10 caracterizado pelo fato de que a dita reação é realizada em um meio hidroalcoólico contendo um álcool alifático e na presença de óxido de metal bivalente.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita reação ocorre em um meio contendo um solvente polar aprótico e na presença de um óxido de metal bivalente.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita reação é realizada em um meio consistindo em um sistema de duas fases formado por água/solvente orgânico e na presença de óxido de metal bivalente.

- 20 4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os álcoois alifáticos são selecionados de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o álcool alifático é isopropanol em uma concentração entre 0,1 e 50 % expressa como uma % em volume sobre o volume do tampão de partida.
- 5 6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a concentração de isopropanol é 10 %.
7. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os solventes polares apróticos são selecionados de dimetilsulfóxido, acetonitrila, dimetilformamida e N-metil-pirrolidona.
- 10 8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o solvente polar aprótico é dimetilsulfóxido em uma concentração entre 0,1 e 50 % expressa como uma % em volume sobre o volume do tampão de partida.
9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo
- 15 fato de que a concentração de dimetilsulfóxido é 1,25 %.
10. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que os solventes orgânicos são selecionados de n-hexano, tolueno, benzeno e n-butanol.
11. Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado
- 20 pelo fato de que o solvente orgânico é n-hexano em uma concentração entre 0,1 e 40 % expressa como % em volume sobre o volume do tampão de partida.
12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a concentração de n-hexano é 1,25 % ou 2,5 %.
- 25 13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o óxido de metal bivalente é óxido de cálcio ou magnésio ou zinco em uma concentração entre 0,1 e 1 M.
14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a concentração dos óxidos selecionados é de 0,33 ou 0,54
- 30 M.
15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a concentração de serina varia entre 1 e

5 gg/gg de fosfatidilcolina.

16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a concentração de serina varia entre 2 e 3 gg/gg de fosfatidilcolina.

5 17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a fosfatidilcolina é de origem animal e/ou vegetal, natural ou sintética, presente na forma purificada ou como matéria-prima, em uma concentração de partida entre 10 e 500 mg/ml, preferivelmente entre 200 e 300 mg/ml.

10 18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que a reação de transfosfatidilação ocorre em uma temperatura entre 20°C e 60°C e preferivelmente em 45°C.

15 19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que a reação de transfosfatidilação ocorre em uma temperatura entre 20°C e 60°C e preferivelmente em 55°C.

20 20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que a enzima PLD é de origem fermentativa derivada do microorganismo *Streptovercillium hachijoense*, usada na forma purificada, parcialmente purificada ou não purificada.

20 21. Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a concentração de PLD que é usada varia entre 1 e 100 unidades/g de fosfatidilcolina.

25 22. Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a concentração de PLD que é usada varia entre 1 e 10 unidades/g de fosfatidilcolina.

23. Processo para a purificação de fosfatidilserina (PS) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que envolve as seguintes etapas:

30 I) adição de uma solução salina de cloreto de sódio ao meio de reação contendo a PS que foi produzida, com a subsequente mistura e separação da PS;

II) coleta e eliminação do subnadante;

III) as etapas I e II podem ser repetidas modificando a concentração de partida da solução de cloreto de sódio e eliminando o sobrenadante;

5 IV) adição de uma solução de EDTA para quelar os íons presentes na solução, e subsequente mistura;

V) adição de uma solução de etanol consistindo em etanol em uma porcentagem de 50 a 100 % ou uma mistura de acetona/água consistindo em acetona em uma porcentagem de 50 a 95 % com subsequente mistura e sedimentação da PS;

10 VI) a etapa V pode ser repetida modificando a porcentagem de etanol;

VII) adição de uma solução de etanol consistindo em etanol em uma porcentagem de 90 a 100 %;

VIII) coleta e eliminação do sobrenadante;

15 IX) secagem do produto final obtido.

24. Processo para a purificação de fosfatidilserina (PS) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que envolve as seguintes etapas:

20 I) adição de uma solução salina de cloreto de sódio a PS que foi anteriormente filtrada, com a subsequente mistura e separação da PS;

II) coleta e eliminação do sobrenadante;

III) as etapas I e II podem ser repetidas modificando a concentração de partida da solução de cloreto de sódio e eliminando o sobrenadante;

25 IV) adição de uma solução de EDTA para quelar os íons presentes na solução, e subsequente mistura;

30 V) adição de uma solução de etanol consistindo em etanol em uma porcentagem de 50 a 100 % ou uma mistura de acetona/água consistindo em acetona em uma porcentagem de 50 a 95 % com subsequente mistura e sedimentação da PS;

VI) a etapa V pode ser repetida modificando a porcentagem de etanol;

VII) adição de uma solução de etanol consistindo em etanol em uma porcentagem de 90 a 100 %;

VIII) coleta e eliminação do sobrenadante;

IX) secagem do produto final obtido.

5 25. Processo para a purificação de fosfatidilserina (PS) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que envolve as seguintes etapas:

10 I) adição de uma solução salina de cloreto de sódio ao meio de reação contendo a PS que foi produzida, com subsequente mistura e separação da PS;

II) coleta e eliminação do subnadante;

III) adição de uma solução salina de cloreto de sódio e execução da ultrafiltração através de uma membrana porosa;

IV) secagem do produto final.

15 26. Composições farmacêuticas, caracterizadas pelo fato de que contêm fosfatidilserina produzida e purificada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

20 27. Uso das fosfatidilserinas produzidas e purificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de fármacos para a prevenção e tratamento de patologias ligadas com o envelhecimento cerebral.

28. Uso de fosfatidilserinas produzidas e purificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de suplementos alimentícios.

25 29. Uso das fosfatidilserinas produzidas e purificadas como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de lipossomas para uso no campo de cosmética e como um sistema para a liberação controlada de fármacos.

30 30. Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a enzima PLD derivada do microorganismo *Streptoverticillium hachijoense* é purificada envolvendo as seguintes etapas:

I) eliminação do agente de produção mediante a microfiltração

com um tamanho de poro de 0,2 μm ;

II) ultrafiltração através de filtros com um corte molecular de 10.000 D;

5 III) ultrafiltração através de filtros com membranas com um corte molecular de 300.000 D;

IV) ultrafiltração através das membranas com um corte molecular de 10.000 D para reconcentrar a enzima e diálise em oposição ao tampão ácido.



Fig .1

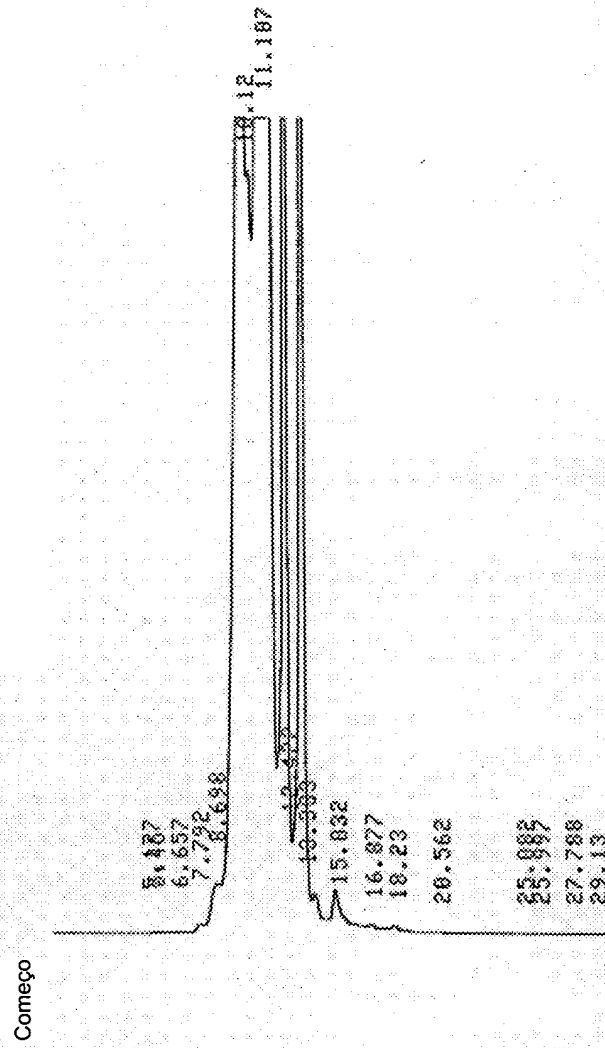
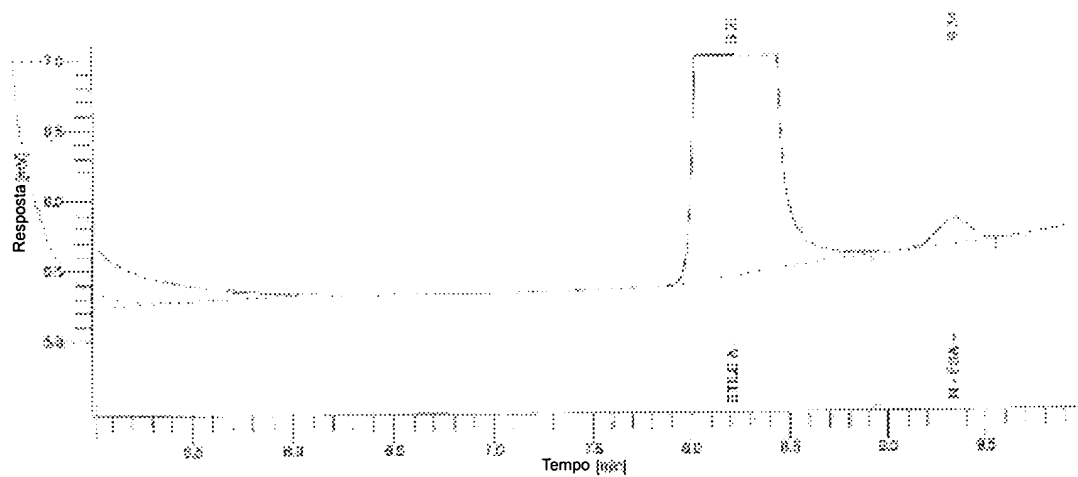


Fig .2



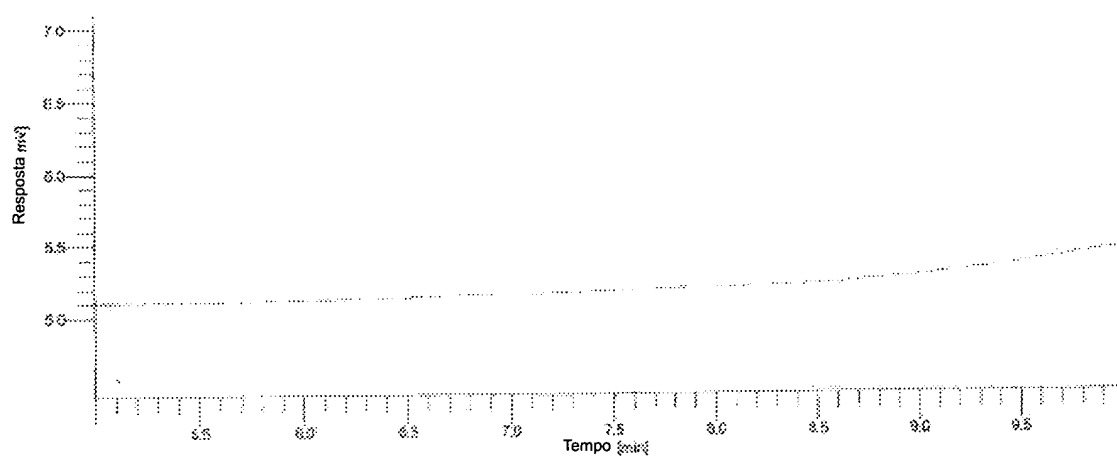
Peak #	Nome do componente	Tempo [min]	Área [uV*min]	Altura [mV]	Área [%]	St. [%]	Solvente
1	Acetato de etila	1.213	267730	47354	71.3	100	1000
2	N-Estir	9.737	2103	164	0.3	100	1000

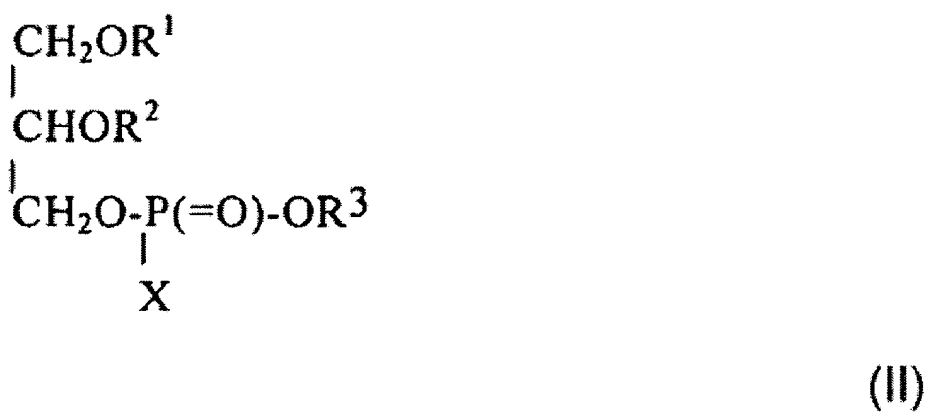
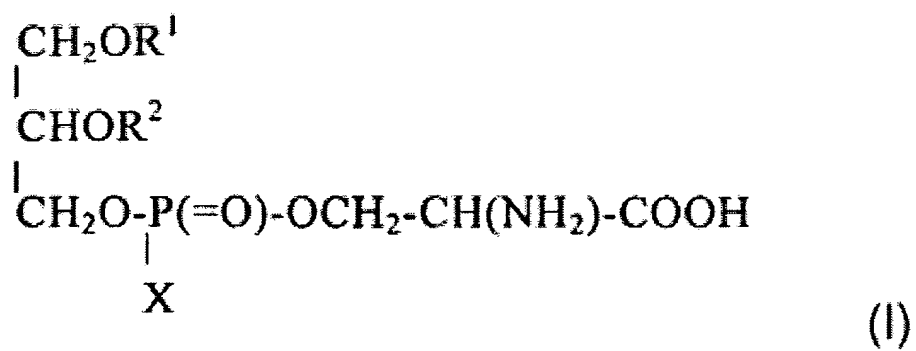
Relatório de componente ausente

Retenção esperada de componentes

Todos os componentes foram encontrados

Fig .3

**Fig .4**



RESUMO

Patente de Invenção: "**PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE FOSFATÍDEOS, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E RESPECTIVOS USOS**".

- 5 A presente invenção refere-se ao processo para a preparação de fosfatidilserina de fórmula $\text{CH}_2\text{OR}^1 \text{CHOR}^2 \text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ X em que R_1 e R_2 independentemente uma acila $\text{C}_{10}-\text{C}_{30}$ saturada, monoinsaturada ou poliinsaturada, X = OH ou OM onde M = metal alcalino ou alcalino terroso, amônio, alquilamônio (incluindo o sal interno) incluindo a
- 10 reação de transfosfatidilação entre fosfatidilcolina da fórmula geral $\text{CH}_2\text{OR}^1 \text{CHOR}^2 \text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})-\text{OR}^3$ X em que R^1 e R^2 e X possuem os significados especificados acima, $\text{R}^3 = \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ou $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ e Serina na forma D, L ou racêmica catalisada pela enzima fosfolipase D (PLD), caracterizado pelo fato de que dita reação é realizada em um meio hidroalcoólico
- 15 contendo um álcool alifático e na presença de óxido de metal bivalente.