INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1180161 E**

(51) Classificação Internacional:
C12P 33/00 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2000.05.29**

(30) Prioridade(s): **1999.06.01 IT MI99122**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.02.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.02**
001/2007

(73) Titular(es):
INDENA S.P.A.
12, VIALE ORTLES I-20 139 MILANO **IT**

(72) Inventor(es):
CESARE PONZONE **IT**
MARIO DE ROSA **IT**
ALESSANDRA MORANA **IT**
ANTONELLA DI LAZZARO **IT**

(74) Mandatário:
MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº69 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE GLICÓSIDOS ESTERÓIDES DE RUSCUS ACULEATUS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

(57) Resumo:

RESUMO

"UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE GLICÓSIDOS ESTERÓIDES DE *RUSCUS ACULEATUS* POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA"

Um processo para a preparação de desglucodesramnoruscina que compreende a hidrólise enzimática de glicósidos esteróides de *Ruscus Aculeatus* (ruscosaponinas) por intermédio de hidrolases em bruto de *aspergillus niger*.

DESCRIÇÃO

"UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE GLICÓSIDOS ESTERÓIDES DE *RUSCUS ACULEATUS* POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA"

O presente invento refere-se a um processo para a preparação de derivados de glicósidos esteróides de *Ruscus Aculeatus* (ruscosaponina).

Mais particularmente, o invento refere-se a um processo para a preparação de desglucodesramnoruscina por hidrólise enzimática parcial de ruscina, desglucoruscina ou ruscósido.

Em DE2202393 obtém-se desglucodesramnoruscina a partir de desglucoruscina por aquecimento em ácido acético.

Perepelitsa *et al.* (1975) *PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA*, 11, 901-905, utilizam hidrolases de *A. niger* para obter dioscina e trilina e protodioscina por clivagem de ligações glucose-ramnose.

A hidrólise enzimática de acordo com o invento é efectuada por intermédio de preparações enzimáticas em bruto à base de hidrolases extraídas de *Aspergillus niger*. Essas preparações estão comercialmente disponíveis e são utilizadas nas indústrias vinícola e alimentar. É particularmente preferida a utilização da preparação

disponibilizada comercialmente pela Gist Brocades com a marca registada Cytolase PCL5.

Essas preparações enzimáticas têm, simultaneamente, actividades de β-glucopiranosidase e α-ramnopiranosidase e, em consequência, proporcionam a remoção sequencial do resíduo β-glucósido seguida da remoção do resíduo α-ramnósido para obter o produto desejado.

A hidrólise enzimática é efectuada em solução aquosa tamponada para pH 5 ou em água contendo até cerca de 30% por volume de etanol. Foi observado que, na prática, a presença de etanol não afecta adversamente a actividade enzimática: a actividade de β-glucopiranosidase aumenta na presença de etanol, ao passo que, por outro lado, a actividade de α-ramnopiranosidase decresce ligeiramente mas numa extensão que não afecta, de modo nenhum, a reacção do invento. É necessária uma percentagem de cerca de 30% v/v de etanol para a solubilização completa da desglucoruscina, ao passo que são necessárias percentagens inferiores, de cerca de 17% v/v, para o ruscósido. Em consequência, a utilização do último pode, por vezes, ser preferida também por não requerer nenhuns pré-tratamentos específicos e por, devido às suas propriedades de actividade de superfície, solubilizar a desglucoruscina resultante do primeiro passo da hidrólise enzimática, que então pode ser transformada mais eficientemente em α-ramnopiranosidase.

A concentração de ruscosaponina pode variar desde cerca de 5 até cerca de 40% p/v, e a hidrólise é efectuada a temperaturas que variam desde 20 até 50°C durante períodos de tempo que variam desde 3 até 7 dias.

No final do processo de bioconversão, o produto final desglucodesramnoruscina, insolúvel no sistema reaccional, pode ser facilmente recuperado por centrifugação e lavagem subsequente com metanol. Suplementarmente, o processo do invento pode ser realizado continuamente, removendo o produto hidrolisado em instantes fixos e adicionando continuamente substrato fresco, graças à estabilidade das enzimas utilizadas. Para esta finalidade será preferivelmente utilizado um biorreactor equipado com uma membrana de ultrafiltração, para evitar a acumulação de inibidores e moléculas desnaturantes.

O exemplo seguinte ilustra o invento com mais pormenor.

Exemplo

A preparação enzimática Cytolase PCL5 (Gist Brocades) foi diafiltrada antes de ser utilizada contra tampão de citrato-fosfato 0,1 M pH 5 num aparato Amicon equipado com uma membrana XM (limite 50 kDa), para remover agentes desnaturantes e inibidores.

Preparou-se a mistura de incubação adicionando, pela ordem seguinte: substrato (desglucoruscina ou ruscósido), tampão de citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0,

Cytolase PCL5 e lentamente, com agitação, etanol. A concentração do substrato variou desde 5 até 40% (p/v) e a concentração de etanol desde 0 até 30% (v/p). A reacção foi seguida por TLC em placas de sílica gel (60 F250 da Merck) com acetato de etilo/metanol/água 100:15:10 como eluente. A activação da preparação enzimática consistiu em 38 unidades de β-glucopiranosidase e em 2,3 unidades de α-ramnopiranosidase por ml de mistura de incubação.

A bioconversão foi efectuada a uma temperatura de 25°C. A transformação em desglucodesramnoruscina foi completada em cerca de 72 horas partindo de desglucoruscina e em cerca de 96 horas partindo de ruscósido.

Em seguida, a mistura de incubação foi centrifugada a 12 100 g durante 30 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com metanol e centrifugado novamente nas mesmas condições de acima. Repetiu-se este passo cinco vezes e reuniram-se os sobrenadantes. Em seguida, evaporou-se a solução de metanol sob vácuo e triturou-se o produto resultante, obtendo-se um pó fino amarelo escuro contendo 20% de desglucodesramnoruscina (ensaio de HPLC).

Lisboa, 05/12/2006

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de desglucodesramnoruscina, que compreende a hidrólise enzimática parcial de ruscina, desglucoruscina ou ruscósido (ruscosaponinas) por intermédio de preparações em bruto baseadas em hidrolases extraídas de *Aspergillus niger*, cujas preparações enzimáticas têm, simultaneamente, actividades de β-glucopiranosidase e α-ramnopiranosidase e proporcionam a remoção sequencial do resíduo β-glucósido seguida da remoção do resíduo de α-ramnosidase.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a hidrólise é efectuada em solução aquosa a pH 5 ou em mistura água-etanol contendo até 30% por volume de etanol.

3. Processo como reivindicado nas reivindicações 1-2, em que a concentração de ruscosaponinas varia desde 5 até 40% p/v.

4. Processo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações acima, em que a hidrólise é efectuada a temperaturas desde 20 até 40°C durante períodos de tempo desde 3 até 7 dias.

5. Processo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações acima, em que o produto final é recuperado por centrifugação e lavagem com metanol.

Lisboa, 05/12/2006