

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 94.253

REQUERENTE: RHONE-POULENC INC., norte-americana, com se
de em 125 Black Horse Lane, Monmouth
Junction, New Jersey 08852, Estados Unidos
da América

EPÍGRAFE: "Processo para o siolamento, imobilização e
utilização de enzimas e isozimas para a pre-
paração de lipase a partir de candida rugosa"

INVENTORES: Carrington S. Cobbs,
Michael J. Barton,
Lin Peng,
Animesh Goswami,
Adrien P. Malick,
John P. Hamman,
Gary J. Calton,

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

U.S.A., 05 de Junho de 1989, sob o Nº 361.049

4

RHONE-POULENC INC.

"PROCESSO PARA O ISOLAMENTO, IMOBILIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE EN-
ZIMAS E ISOZIMAS PARA A PREPARAÇÃO DE LIPASE A PARTIR DE
CANDIDA RUGOSA"

A presente invenção diz respeito ao isolamento, imobilização e utilização de enzimas e isozimas para a preparação de lipase a partir de Candida rugosa.

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

Durante alguns dos últimos anos, foi alvo de atenção considerável a utilização de lipases ou de estearases para hidrolisar estereosseletivamente os ésteres. Ver Cambou B. and A.M. Klibanov, Lipase-Catalyzed Production of Optically Active Acids via Asymmetric Hydrolysis of Esters/Effect of the Alcohol Moiety, Appl Biochem & Biotech 9, 225-260 (1984); Dahod, S.K. and P. Siuta-Mangano, Resolution of Racemic Mixture of Aliphatic Acid Esters, Stauffer Chemical Company, European Patent Application 86104201.8 (0326-1986) (hereinafter Dahod, EPA); Dahod, S.K. and P. Siuta-Mangano, Carbon Tetrachloride-Promoted Stereo Selective Hydrolysis of Methyl-2-Chloropropionate by Lipase, Biotech. & Bioeng. 30, 959-999 (1987) (hereinafter Dahod Biotech); and Walts, A.E., Fox, E.M., and C.B. Jackson, R-Glycidyl Butyrate: Evolution of A Laboratory Procedure to an Industrial Process, Biotech USA 1987, Online International, London. Este facto deve-se ao desejo de se produzirem intermediários agrícolas ou farmacêuticos com uma estereoquímica particular em que o enantiómero indesejável possuísse pouca ou nenhuma actividade, não obstante pudesse ser responsável por uma toxicidade indesejável. Ver Calton, G.J., Use of Microorganisms and Enzymes in the

Synthesis and Production of Optically Active Agricultural Chemicals, ACS Symposium Series 334 Biotechnology in Agricultural Chemistry, Amer. Chem. Soc., Washington D.C., 1987. Integram-se nesta categoria diversos derivados do ácido propiônico que se utilizam nos campos agrícola e farmacêutico. See Dahod EPA, Dahod Biotech; and Calton, and Caldwell, J., Hutt, A. J., and Fournel—Gigleux S., The Metabolic Chiral Inversion and Dispositional Enantioselectivity of the 2-Arylpropionic Acids and Their Biological Consequences, Biochemical Pharmacology 37, 105-114 (1988).

Apesar de se ter ensaiado um grande número de lipases para a resolução dos alcoóis racêmicos e/ou dos ácidos carboxílicos, estas geralmente, não apresentaram um grande sucesso devido às enantiospecificidades serem inferiores a 95%. Aceita-se, de um modo geral, que é necessária uma selectividade enantiomérica superior a 95% para um processo industrial significativo. Ver Akiyama, A., Bednarski, M., Kim, M.-J., Simon, E.S., Waldmann, H. and Whitesides, G.M., Enzymes in Organic Synthesis, Chemtech 1988, 627-634 (daqui em diante Whitesides). Apenas um pequeno número de lipases referidas literariamente, apresenta um elevado grau de estereospecificidade. Ver Dahod EPA; Dahod Biotech; Walts, Nissan Chem Ind Japanese Pat Appl 8 6-20283/31; Stokes, T.M. and A.C. Oehlschlager, Enzyme Reactions in Apolar Solvents: The Resolution of ($\pm$)-Sulcatol With Porcine Pancreatic Lipase, Tetra. Lett. 28, # 19, 2091-2094 (1987); Kodera, Y., Takahashi, K., Nishimura, H., Matsushima, A., Saito, Y., and Y. Inada, Ester Synthesis from -substituted Carboxylic Acid Catalyzed by Polyethylene Glycol-Modified Lipase From Candida rugosa in Benzene, Biotech. Lett. 8, 881-884 (1986); and Klibanov, A.M.

e Kirchner, G. Enzymatic Production of Optical Isomers of 2-Halopropionic Acids, U.S. Patent 4,601,987, July 22, 1986.

Também se examinaram exaustivamente as lipases para a produção de ésteres ópticamente activos a partir de misturas de ácidos e/ou alcoóis e, apresentaram uma boa enantioselectividade para a esterificação com alcóois de cadeias longas. Ver Klivanov, A.M. and Kirchner, G., Enzymatic Production of Optical Isomers of 2-Halopropionic Acids, U.S. Patent 4,601,987, Jul 22, 1986; and Cambou B. and Klivanov, A.M., Preparative Production of Optically Active Esters and Alcohols Using E s t e r a s e - C a t a l y z e d S t e r e o s p e c i f i c Transesterification in Organic Media, J. Am. Chem. Soc. 106, 2687-2692 (1984).

Utilizou-se extensivamente a lipase de Candida Rugosa (conhecida primeiramente, como Candida cylindracea) que apresentou uma estereoespecificidade limitada na hidrólise de alguns ésteres. Este enzima encontra-se comercialmente disponível a partir de um vasto número de fontes, incluindo a Sigma, Meito Sangyo, Biocatalysts, Enzyme Development Corp e Amano. A sua produção baseia-se na extracção a partir de caldos de fermentação e de células de C. rugosa ATCC # 14830. O trabalho anterior demonstrou que a lipase da C. rugosa (Sigma) não proporcionava uma hidrólise estereoespecífica dos ésteres metílicos do ácido 2-cloropropiónico, mas proporcionava um elevado excesso enantiomérico na hidrólise do éster octílico do ácido 2-cloropropiónico. Ver Klivanov, A.M. and Kirchner, G., Enzymatic Production of Optical Isomers of 2-Halopropionic Acids, U.S. Patent 4,601,987, Jul 22, 1986. Para além disso, demonstrou-se que a síntese do éster octílico era absolutamente estereoespecífica. Ver Cambou B. and Klivanov, A.M., Preparative Production of Optically Active

Esters and Alcohols Using Esterase-Catalyzed Stereospecific Transesterification in Organic Media, J. Am. Chem. Soc. 106, 2687-2692 (1984).

Também se descobriu que, numa mistura a duas fases aquosa/orgânica, a baixas temperaturas, (4°C), se podia obter uma elevada pureza óptica (90% ee) após hidrólise a 30%. De um modo interessante observou-se que os solventes altamente clorados eram superiores nesta hidrólise e que o CCl_4 activou o enzima na presença de substrato, enquanto que na ausência de substrato o CCl_4 desactivou rapidamente o enzima. Ver Dahod e Siuta-Mangano. Também se demonstrou que a pureza óptica obtida na reacção era uma função da extensão da hidrólise, de acordo com as previsões anteriores e que a pureza óptica decresceu rapidamente à medida que a reacção se aproximava da hidrólise completa de um dos enantiómeros.

Sih e colaboradores (Sih, C. J., Gu, Q.-M., Fulling, G., Wu, S.-H and Reddy, D.R. J. Indus. Micro Suppl 3, Develop Ind Micro., 1988, 29, 221-229; Gu, Q.-M., Chen, C.-S. and Sih, C. J. Tet Lett 1986, 27, 1763-1766) descobriram uma excelente resolução do enantiómero (S) dos ácidos 2-arilpropiónico, dependendo da natureza do substituinte arilo. Para o ácido 2-(6-metoxi-2-naftil)-propiónico (naproxen) e para o ácido p-isobutil-hidratrópico (ibuprofen), a enantioespecificidade da lipase de Candida rugosa era superior a 98% ee. No entanto, para o ácido 2-(3-benzoil-fenil)-propiónico (Cetoprofen), o ee foi apenas de 51%.

Os trabalhadores da Nissan Chemical Industries (Patente de invenção japonesa 255917, 1986 da Nissan Chem Ind) tentaram tirar proveito da hidrólise estereosselectiva através

de uma preparação de lipase Candida rugosa para a produção de um ácido ariloxi-propiónico, (R)-(+)-2-(4-hidroxi-fenoxi)-propiónico (R-HPPA); no entanto, apenas obtiveram um ee de 87% numa hidrólise a 21% em solução aquosa.

Fez-se referência à lipase de Candida rugosa como se se tratasse de um único enzima, tendo em vista a sua fonte, apesar de ter sido publicada recentemente a separação do enzima bruto. Ver Abramowicz, D. A. and Keese, C.R., Enzymatic Transesterifications of Carbonate in Water-Restricted Environments, Biotech. Bioeng. 33, 149-156 (1989). No entanto é sabido, através da literatura existente, que muitos enzimas contêm um determinado número de isózymas diferentes com diferentes especificidades. Isolaram-se os isózymas da estearase do fígado de um suíno. Ver Farb, D.H., Multiple Forms of Microsomal Porcine Liver Esterase: I. Isolation and Properties, Estimation of Secondary Structure II. pH Dependence of Rate Contacting Groups, Diss Ab.Int B 38, 5900-5901 (1978); Farb, D. and Jencks, W.P., Dependence on pH of the Activity of Pig Liver Esterase. Arch. Biophys. 203, 227-35 (1980); and Guanti, G., Banfi, L., Narisano, E., Riva, R. and Thea, S., Enzymes in Asymmetric Synthesis: Effect of Reaction Media on the PLE Catalyzed Hydrolysis of Diesters, Tet. Let. 27, 4639-4642 (1986). Dependendo do substrato, cada um destes isózymas pode reagir de modo diferente às alterações nas condições de reacção e pode proporcionar estereoespecificidades diferentes. Contudo, não existe qualquer indicação da existência de isózymas na lipase da C. rugosa, apesar de se ter investigado o enzima extensivamente, utilizando até, a focalização isoeléctrica. Ver Gerlach, D., Schneider, S., Gollner, T., Kim, K. S., and Schreier, P., Screening of Lipases for Enantiomer

Resolution of Secondary Alcohols by Esterification in Organic Medium, Bioflavour '87, Proc. Int. Conf., 1988 Walter de Gruyter & Co., Berlin.

Não apresentando qualquer oposição aos esforços anteriores, existe ainda um âmbito considerável para se proporcionarem procedimentos melhorados para se hidrolisar estereosselectivamente ou se trans-esterificarem ésteres ou para a esterificação de ésteres ou de alcoóis de acordo com meios enzimáticos. Por exemplo, existe um interesse continuado na hidrólise enzimática do propionato de (R,S)-(+)-metil-2-(4-hidroxi-fenoxi) (HPPA-Me) para se produzir (R)-HPPA em quantidades superiores a 95% ee. O HPPA racémico é um valioso intermediário na produção de determinados herbicidas. Descobriu-se que mais de 95% da actividade herbicida do etilo de quizalofop reside no isómero (R) que é sintetizado, de modo conveniente, a partir de (R)-HPPA. Por isso se reveste de considerável importancia a possibilidade de resolver o éster racémico de HPPA de um modo económico, para produzir este intermediário em escala industrial. Um dos objectivos da presente invenção consiste em proporcionar tais aperfeiçoamentos dos procedimentos de hidrólise enzimática, esterificação e trans-esterificação. Tornar-se-ão evidentes, daqui em diante, outros objectivos.

SUMARIO DA PRESENTE INVENÇÃO

A presente invenção proporciona processos para hidrolisar, de um modo estereosselectivo, misturas racémicas de ésteres de ácidos substituídos na posição 2, com determinadas preparações de lipase de Candida rugosa em sistemas aquoso/orgânicos, em que o ácido não é substituído na posição 2 por um átomo de

halogéneo. Estes processos são altamente estereosselektivos para a hidrólise. A presente invenção também contempla processos que envolvem a trans-esterificação de diversos ésteres e a esterificação de ácidos e de alcoóis. A presente invenção inclui, também, um processo para a produção de ácido R-2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico com um excesso enantiomérico elevado, utilizando um enzima. A presente invenção inclui, também, dois isózymas altamente úteis, que se descobriu estarem presentes nas preparações de lipase de Candida rugosa e, um processo para a separação e purificação desses isózymas a partir da lipase de Candida rugosa, por cromatografia, bem como por focalização isoelétrica. A utilização destes isózymas para hidrólise de ésteres, trans-esterificação de ésteres e esterificação de ácidos constitui um outro aspecto da presente invenção. Para além disso, proporciona-se a utilização destes isózymas para hidrolisar, esterificar ou trans-esterificar estereosselektivamente. Divulgam-se métodos de imobilização e proporciona-se a utilização dos isózymas imobilizados bem como da lipase imobilizada da Candida rugosa. Também se proporciona um método para a purificação da actividade enzimática por imobilização. Para além disso, divulga-se um método para a utilização de agentes redutores para estabilizar as hidrólises enzimáticas. Também se descreve a utilização de enzimas, isózymas e suas formas imobilizadas na presença de dissolventes orgânicos. Proporcionam-se processos para a produção estereosselektiva de ácidos 2-ariloxi substituídos e descreve-se a produção de ácido R-2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico utilizando isózymas. Descreve-se a produção estereoselektiva pelos isózymas dos ácidos 2-arilpropiónicos e também se proporcionam processos para a produção de S-cetoprofeno, S-ibupro-

feno, S-fenoprofeno, ácido S-2-fenilpropiónico e S-indoprofeno, por esta via. Também se proporciona um método para aumentar a proporção ou a estereosseletividade de uma reacção mediada pela lipase.

De acordo com um dos aspectos da presente invenção, proporciona-se um processo para hidrolisar, de um modo estereosselectivo, ésteres em ácidos num excesso enantiomérico elevado, quer com enzimas livres ou imobilizados num sistema orgânico aquoso com duas fases em que a fase orgânica consiste num dissolvente orgânico aromático e em que a posição dois do ácido não se encontra substituída por um átomo de halogéneo.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um processo para a produção de ácido R-2-(4-hidroxifênoxi)-propiónico com enzimas de Candida rugosa.

Outros aspectos da presente invenção incluem o seguinte

1) um processo para melhorar a estabilidade de um enzima ou de um insóзима, utilizado na produção de ácido 2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico, com a utilização de um agente redutor;

2) um processo para a purificação e separação de isózymas a partir de preparações de lipase de Candida rugosa, que consiste na utilização de cromatografia de permuta iónica, com um esquema de eluição adequado para separar os isózymas da lipase.

3) um processo para purificar e separar os isózymas da lipase de Candida rugosa utilizando focalização isoeléctrica;

4) um insóзима isolado da lipase de Candida rugosa e que possui a sequência aminoácida da extremidade amino N:

Ala-Pro-Thr-Ala-U-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-

Pro-Pro-Y-Z-Asn-P

na qual U, V, W, X, Y e Z representam aminoácidos e
P representa o resíduo do peptido.

De um modo mais específico, e ainda de acordo com a presente invenção, proporciona-se um isóзима isolado, referido como CSC-1, e que possui a sequência aminoácida da extremidade N:

Ala-Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-
Pro-Pro-Val-Gly-Asn-P

na qual V representa um aminoácido e P representa o resíduo do peptido. Também de acordo com a presente invenção, proporciona-se um isóзима isolado, referido como CSC-2, que possui a sequência aminoácida da extremidade N:

Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-Leu-Phe-Ile-ZZ-Leu-P

na qual W, X, Y, Z, e ZZ representam aminoácidos e P representa o resíduo do peptido.

Será evidente para o especialista na matéria que os isózymas descritos antes podem obter-se de acordo com mé-

todos que envolvem o ADN recombinante, em que se tornem possíveis outros métodos de isolamento. Também é evidente que se podem efectuar pequenas alterações na sequência de aminoácidos menores na estrutura dos isózymas anteriormente descritos, que envolvem o ADN recombinante, sem se afectar a natureza da acção e a especificidade dos isózymas, embora alterando a sequência aminoácida anteriormente dada;

5) um processo para a hidrólise de ésteres na presença de um isózyma de lipase;

6) um processo para a esterificação de ácidos ou de alcoóis na presença de um isózyma de lipase;

7) um processo para a trans-esterificação de ésteres na presença de um isózyma de lipase;

8) um processo para se hidrolisarem estereosselectivamente, ésteres na presença de um isózyma de lipase;

9) um processo para se esterificarem estereosselectivamente ácidos ou alcoóis na presença de um isózyma de lipase;

10) um processo para efectuar a trans-esterificação de ésteres, estereosselectivamente, na presença de uma isózyma de lipase;

11) processos para se imobizarem os enzimas e isózymas da lipase de Candida rugosa;

12) processos para se utilizarem os enzimas imobilizados e os isózymas imobilizados da lipase de Candida rugosa;

13) um processo para a purificação de um enzima por imobilização;

14) processos para a utilização dos enzimas, isozimas ou enzimas imobilizados ou isozimas imobilizados em sistemas em duas fases aquosa/orgânica;

15) um processo para a produção de enantiómeros específicos de ácidos 2-ari-loxi substituídos com isozimas de lipase;

16) um processo para a produção de ácido R-2-(4-hidroxifenoxi)propiónico com isozimas de lipase;

17) um processo para a resolução de ácidos 2-arylpropiónicos com isozimas de lipase. De um modo específico, encontram-se incluídos processos para a produção de S-cetoprofeno, S-ibuprofeno, S-fenoprofeno, ácido S-2-fenil-propiónico e S-indoprofeno. Estes processos revestem-se de especial valor para determinados ésteres que se descrevem; e

18) a utilização de determinados aditivos que aumentam a proporção de estereosselectividade da lipase de Candida rugosa ou dos isózymas de Candida rugosa.

Na descrição pormenorizada que se segue evidenciam-se características adicionais, objectivos e vantagens da presente invenção

DESCRIÇÃO DOS ASPECTOS PREFERENCIAIS

A presente invenção inclui um processo para se efectuar a hidrólise, de um modo estereosselectivo, de misturas racémicas de ésteres em ácidos. Este processo compreende as seguintes fases:

a) imobilização do enzima de lipase ou de um isozima de Candida rugosa; e

b) fazer contactar o enzima imobilizado ou o isozima com uma mistura racémica de ésteres na presença de um dissolven

te orgânico que aumenta a estereosseletividade do processo. Os dissolventes orgânicos que otimizam a estereosseletividade do processo incluem dissolventes orgânicos aromáticos, especialmente hidrocarbonetos aromáticos. Um dissolvente orgânico especialmente preferido é o tolueno. Ver exemplo 6. No entanto, também se podem utilizar outros dissolventes orgânicos. Estes incluem, sem qualquer limitação, hidrocarbonetos halogenados.

As condições de reacção, por exemplo, temperatura e tempo, podem variar. Utiliza-se, de um modo vantajoso a temperatura ambiente (20° - 25° C), apesar de serem, também úteis outras temperaturas. Podem determinar-se facilmente, para qualquer situação específica, os tempos de reacção óptimos, pH e outras condições.

Os ésteres preferenciais, que se podem hidrolisar estereoespecificamente, de acordo com as reivindicações da presente invenção, utilizando o enzima de lipase ou isozimas de Candida rugosa são os ésteres de ácidos 2-(ariloxi)-propiónicos, especialmente do ácido 2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico (referido, algumas vezes daqui em diante como "HPPA"). A estereosseletividade aumenta quando se imobiliza o enzima, utilizando preferencialmente, um pré-polímero de poliaziridina. Podem adicionar-se agentes redutores, por exemplo, o hidrossulfureto de sódio, em pequenas quantidades para evitar a oxidação de HPPA e dos seus ésteres.

Conforme se indica no exemplo 9, a estereoespecificidade do enzima imobilizado aumenta com a utilização. A primeira hidrólise por lotes de HPPA-Me para HPPA, originou a produção de 82% de R-HPPA e de 18% de S-HPPA, enquanto que na sétima

e na oitava hidrólise por lotes, a conversão foi de 100% de R-HPPA e de 0% de S-HPPA. Apesar da estereoespecificidade apresentar um acréscimo significativo com a utilização, a actividade decresce ligeiramente. O acréscimo de estereoespecificidade obtido de acordo com este processo que se reivindica, é crítico para um processo industrial, uma vez que, conforme se fez anteriormente notar, um processo industrial necessita normalmente de uma percentagem superior a 95% ee.

A presente invenção também inclui, um processo para a purificação e separação estereosselectiva de enzimas de lipase de Candida rugosa, que consiste na utilização de cromatografia de permuta de iões; e na separação dos isózymas de lipase resultantes com um esquema de eluição adequado. O esquema de eluição pode ser um sistema de pH passo a passo ou um esquema de gradiente de pH, ou um esquema de eluição por um sal. O esquema de eluição preferencial consiste no esquema de pH passo a passo. Uma aplicação preferencial deste processo envolve a purificação de enzimas de lipase de Candida rugosa de modo a eluir os dois isozimas CSC-1 e CSC-2.

Pode conseguir-se a purificação e separação dos isozimas estereosselectivos da lipase de Candida rugosa utilizando a focalização isoeléctrica. Conforme se demonstra no exemplo 58, pode separar-se o enzima da lipase de Candida rugosa em dois isozimas, CSC-1, e, CSC-2, os quais demonstraram uma actividade hidrolítica estereoespecífica excepcional.

O processo de purificação e de separação da presente invenção é adequado para utilização em larga escala. Na presente invenção podem utilizar-se diversos suportes de cromatografia. De um modo preferencial, o suporte cromatográfico é subs-

tituido por um ácido forte. De um modo mais específico, deriva-se o suporte cromatográfico com um grupo funcional de sulfopropilo. Os suportes preferenciais incluem SP-TrisacrylTM e SP-SephacrylTM. Ver exemplos 11, 12, 13 e 14.

Conforme se fez anteriormente notar, a presente invenção proporciona um isozima isolado de lipase de Candida rugosa que possui a sequência aminoácida da extremidade N:

Ala-Pro-Thr-Ala-U-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-P

na qual U, V, W, Y e Z representam aminoácidos e P representa um péptido. De um modo mais específico, a presente invenção contempla um isóзима, referido como CSC-1 que possui a sequência:

Ala-Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-V-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-
Pro-Pro-Val-Gly-Asn-P

na qual V representa um aminoácido e P representa um péptido ou o resíduo do péptido. CSC-1 também se caracteriza por um ponto isoelétrico situado entre 5,3 e 5,7 e um peso molecular de 55-65 000.

A presente invenção também proporciona um outro isóзима isolado a partir da lipase de Candida rugosa, referido como CSC-2 e que possui a sequência aminoácida da extremidade N:

Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-Leu-Phe-Ile-ZZ-Leu-P

na qual W, X, Y, Z e ZZ representam aminoácidos e P representa o resíduo do péptido.

Descobriu-se que os isózymas CSC-1 e CSC-2, obtidos a partir da lipase de Candida rugosa possuem estereosselektividades diferentes e, algumas vezes, opostas. Estes isózymas CSC-1 e CSC-2, são úteis na hidrólise estereosselectiva de diversos ésteres; conforme anteriormente descrito.

A lipase de Candida rugosa, que aqui se utiliza tal como a que se utiliza para isolamento dos isózymas indicados, encontra-se disponível a partir de diversas fontes comerciais. Embora os enzimas que se encontram comercialmente disponíveis sejam todos derivados de Candida rugosa, diferem nas suas características de focalização isoelétrica e também apresentam uma grande variação na concentração da proteína que se encontra presente. Descobriu-se, também que as preparações enzimáticas comerciais apresentam graus variáveis de estereoespecificidade para a hidrólise de ésteres. A razão para as diferenças de estereoespecificidade de hidrólise das lipases comercialmente disponíveis deve-se, aparentemente, à variação na concentração de diversas proteínas presentes na lipase de Candida rugosa. Embora os isózymas de CSC-1 e de CSC-2 possam estar presentes em todas as lipases disponíveis de Candida rugosa, dá-se preferência a determinadas destas preparações de lipase como fonte de isozimas. Utiliza-se de um modo vantajoso a lipase MY, de Meito Sangyo, no isolamento dos isózymas CSC-1 e CSC-2. Também são adequadas outras lipases, tais como a lipase AY e a lipase Sigma.

Analísaram-se amostras de CSC-1 e de CSC-2, de acordo com técnicas de micro-sequênciação. A micro-sequênciação indicou que duas fracções são, de facto, enzimas diferentes e

que não degradavam produtos uma da outra. Ver exemplo 13. A micro-sequenciação também indicou que existia uma grande analogia sequencial entre CSC-1 e uma acetilcolina-estearase de Torpedo californica, o gimnoto eléctrico. No entanto, após exame da acetilcolinoestearase do gimnoto quanto à sua capacidade de hidrolisar os ésteres de HPPA, verificou-se uma actividade hidrolítica muito fraca sem estereoespecificidade. Ver exemplo 13.

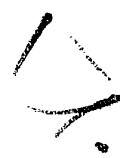
Isto serve para **sublinhar o carácter** pouco óbvio de que se reveste a descoberta de que o isóзима é unicamente eficaz na sua actividade estereoespecífica. A composição dos dois novos isóзимas, CSC-1 e CSC-2, encontra-se ilustrada pelas suas sequências aminoácidas da extremidade N, que anteriormente se fizeram notar, e de acordo com o apresentado no exemplo 13.

Descobriu-se, de acordo com a presente invenção, que quando se utilizam os isóзимas CSC-1 e CSC-2, na hidrólise de uma mistura racémica de um éster, se produzem produtos altamente quirálicos. Demonstrou-se que o isóзима CSC-1 proporciona uma hidrólise altamente estereosselectiva de misturas racémicas de ésteres etílico ou metílico do ácido 2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico. Ver exemplos 15 e 16. O isóзима CSC-2 é especialmente eficaz na hidrólise estereosselectiva de ésteres de cetoprofeno. Pode levar-se a efeito a hidrólise de ésteres utilizando CSC-1 e CSC-2, utilizando um meio de reacção a duas fases (aquosa/orgânica).

As actividades de CSC-1 e de CSC-2 variam significativamente e, pode dar-se preferência a uma delas para qualquer reacção especial. Uma comparação, por exemplo, entre CSC-1 e

CSC-2 mostra que a proporção de conversão do éster metílico de HPPA racémico é muito superior com CSC-1 do que com CSC-2 e que o excesso enantiomérico se encontra também levemente aumentado. Ver exemplo 17. Por outro lado, obtiveram-se resultadados superiores quando se hidrolisaram os ésteres de cetoprofeno com CSC-2. O isóxima CSC-2, é, também superior à lipase MY para a hidrólise de ésteres de cetoprofeno e, a proporção para a hidrólise com CSC-2 é, também, significativamente melhor da da lipase MY, apesar de se poder utilizar a própria lipase. Ver exemplos 18 e 19. A utilização de uma mistura a duas fases no iso-octano ou em dissolventes semelhantes (de preferência hidrocarbonetos) também proporciona excelentes excessos enantioméricos (ee). Ver exemplo 18. Uma comparação do efeito de CSC-1, CSC-2 e da lipase MY indica a superioridade de CSC-2 na hidrólise do monoglicerido de cetoprofeno para além do seu excesso enantiomérico. Ver exemplo 19.

Podem utilizar-se, de um modo proveitoso, os dissolventes orgânicos para aumentar a solubilidade dos ésteres metílicos de cetoprofeno em água que usualmente se trata com um tampão para proporcionar um pH de cerca de 6-8. No entanto, deve ter-se cuidado para assegurar que o dissolvente utilizado, ou as quantidades do mesmo não afectem os resultados. Deste modo, por exemplo, descobriu-se que a dissolução de ésteres de cetoprofeno em dimetilformamida (DMF) com quantidades progressivamente superiores de DMF pode ter um efeito prejudicial no isóxima CSC-2. A hidrólise em larga escala de monoglicerido de cetoprofeno, pode, também, apresentar um baixo excesso enantiomérico quando se adiciona uma quantidade substancial de DMF. Ver exemplos 20 e 21.



De acordo com um outro aspecto da presente invenção, pode efectuar-se a hidrólise de ésteres com CSC-2 na presença de um tensioactivo. Uma vantagem da utilização de um aditivo tal como um tensioactivo reside no facto de se poder evitar ou minimizar qualquer efeito adverso de DMF sobre ee. Ver exemplo 22. Os aditivos tensioactivos preferidos incluem os ésteres de oleato, óleos vegetais, óleos animais e outros oleatos contendo tensioactivos.

A utilização de dissolventes de baixa polarização num sistema de duas fases para a hidrólise do monoglicerido de cetoprofeno também apresenta vantagens, proporcionando percentagens superiores de ee. Ver exemplo 23.

Podem imobilizar-se de modo útil os isózymas ou lipase de acordo com uma grande diversidade de procedimentos, proporcionando todos eles materiais activos. Podem depois, utilizar-se os isózymas imobilizados para produzir ácidos quirálicos. Por exemplo, pode imobilizar-se o isózima CSC-1 e utilizar-se na hidrólise de diversos ésteres. A imobilização do isózima CSC-1, utilizando poliaziridina ou Eupergit C, é altamente eficaz nas hidrólises. Ver exemplo 25. O exemplo 33 indica que existe um tempo de vida catalítico aumentado para o CSC-1 imobilizado de acordo com o procedimento de poliaziridina. Pode levar-se a efeito a imobilização na presença de um ácido orgânico. Ver exemplo 29. Também se descobriu que o alcoól de polivinilo possui um efeito benéfico na imobilização da CSC-1 de lipase uma vez que a actividade relativa parece aumentar substancialmente pela adição deste reagente. Ver exemplo 30.

Um método de imobilização preferencial para o isózima CSC-2 envolve a utilização de sílica. Ver exemplo 24.

O exemplo 31 ilustra a imobilização da lipase MY impura. Os ácidos orgânicos parecem possuir um efeito positivo na imobilização, conforme se demonstra com a lipase MY, no exemplo 26. Embora cada um dos ácidos ensaiados se mostrasse um pouco eficaz, parece que os ácidos preferenciais são aqueles que possuem 12-18 átomos de carbono, dando-se preferência ao ácido esteárico. O efeito do ácido esteárico encontra-se relacionado com uma dose inferior a uma concentração de 5%, existindo acima deste nível um efeito de imobilização consistente. Ver exemplo 27. Uma melhor delineação do efeito protector do ácido esteárico indica que 5% de ácido esteárico é óptimo para a actividade relativa. No entanto, podem utilizar-se outras doses eficazes. Ver exemplo 28.

Um método alternativo para a produção de lipases estereoespecíficas demonstra que se podem utilizar permutadores de aniões e de catiões para se isolar CSC-1. Ver exemplo 34.

Os isózymas CSC-1 e CSC-2 são eficazes na hidrólise de ésteres de ácidos 2-arilpropiónicos tais como, por exemplo, os ésteres de ibuprofeno o éster metílico de fenoprofeno, o éster metílico do ácido 2-fenilpropiónico e o monoglicérido de indoprofeno. Tal como se indica no exemplo 35, o ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteroide, resolve-se de modo eficaz pela lipase MY, CSC-2 e CSC-1, sendo as proporções e ee mais elevados com CSC-2. Para o éster metílico de fenoprofeno, outro anti-inflamatório não esteróide, CSC-1 e CSC-2 possuem percentagens e estereosselectividades claramente superiores. Ver exemplo 36.

A percentagem eficaz de hidrólise dos ésteres metílicos de cetoprofeno e ibuprofeno parecem ser superiores com

CSC-2; no entanto, CSC-2 e CSC-1 são iguais na proporção para o fenoprofeno. Ver exemplo 36. O exemplo 37, indica a utilização de CSC-1 e de CSC-2 na resolução do éster metílico do ácido 2-fenilpropiónico. CSC-2 predomina, novamente, em percentagem e estereosselectividade apesar de ambos os insózymas serem superiores à lipase MY, ainda que se utilize a lipase MY numa quantidade muito superior.

A hidrólise do monoglicérido de indoprofeno indica que CSC-2 proporciona uma resolução estereoespecífica na qual a configuração S predomina, ao passo que a lipase MY e CSC-1 proporciona, predominantemente a configuração R. Ver exemplo 38.

A utilização de um tensioactivo na hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno por CSC-2 originou um acréscimo na proporção relativa. O Tween 80, por exemplo, é eficaz quando se adiciona à mistura reaccional na presença ou na ausência de BSA. Ver exemplo 39. Examinou-se depois este efeito, para um grande número de tensioactivos de diversos tipos. Pode observar-se, por exemplo, no exemplo 40 que os principais aceleradores da proporção enzimática para CSC-2 são os ésteres do ácido oleico. Avaliaram-se, em particular, ésteres de oleatos e, descobriu-se que a percentagem de ee e a proporção de hidrólise aumentavam com CSC-2 no monoglicérido de cetoprofeno. Ver exemplo 41. Avaliaram-se outros derivados do ácido oleico que, geralmente não se utilizam como tensioactivos e, demonstrou-se que o ácido oleico e os seus ésteres aumentavam a proporção assim como a enantio-selectividade. Ver exemplo 42.

Os ésteres de oleatos encontram-se também nos óleos naturais. Assim ensaiaram-se também os óleos naturais quanto ao seu efeito na hidrólise. O azeite apresentou uma estimulação

específica da actividade de CSC-2. Ver exemplo 43. Também se demonstrou que o azeite e o óleo de milho actuam como substratos naturais na hidrólise, utilizando CSC-2 e que também se dá a trans-esterificação. Ver exemplo 44. Deste modo, a trans-esterificação pode aumentar o valor de óleos de baixo grau ou indesejáveis que possuem ou que se desejaria que possuíssem ésteres oleicos. Podem, também utilizar-se os isóenzimas da presente invenção, para se hidrolisarem tais óleos que possuem uma baixa graduação para se produzirem ácidos valiosos que é possível separar de acordo com métodos químicos conhecidos. Ver exemplo 44. Também se avaliaram outros triglicéridos que surgem na natureza. Ver exemplo 45. Descobriu-se que os óleos naturais ensaiados, que eram ésteres de glicerol, eram aceleradores da actividade de CSC-2. O exemplo 46 indica que a adição de um determinado número de ésteres oleicos ou de ácido de oleato aumentava a proporção e a enantio-especificidade da hidrólise de ésteres de cetoprofeno por CSC-2 e também indica que o procedimento de extracção utilizado deve ser tal que separe o óleo/ácido oleico do cetoprofeno. Ver exemplo 46.

No entanto, nem todos os óleos intensificam a actividade de CSC-2 com todos os substratos. Por exemplo, o óleo mineral, ou uma mistura de hidrocarbonetos, não acelera a hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno. Ver exemplo 47. Descobriu-se ainda, examinando os ésteres, outros para além dos do ácido oleico e do éster metílico de ácido linoleico que não apresentaram qualquer proporção de aumento. Ver exemplo 48.

Verificou-se que o ácido oleico possuía um efeito intensificador da proporção sobre a lipase MY e sobre CSC-2, mas não sobre CSC-1. O ácido oleico, também aumentava o excesso

enantiomérico de CSC-2, mas não o fazia de modo tão intenso para a lipase MY. Ver exemplo 49. Descobriu-se que o ácido oleico era eficaz na promoção da hidrólise dos ésteres hidroxi de cetoprofeno. Observou-se o efeito do ácido oleico sobre a lipase MY e sobre a lipase B Biocatalyst. Ver exemplo 50. Verificou-se um melhoramento notável na hidrólise do éster 2-cloroetilico de cetoprofeno com CSC-2 e com a lipase MY na presença de ácido oleico e, mais uma vez, o ee aumentou. Ver exemplo 51.

Uma observação cuidadosa da hidrólise com outros enzimas com ácidos oleicos/ésteres e uma comparação do efeito na taxa de recuperação e no ee, demonstrou que a lipase OF e a lipase Biocatalyst de Candida proporciona aumentos dramáticos com ésteres de hidroxi. A estearase do fígado de suínos hidrolisa estes ésteres para proporcionar o enantiômero oposto. Ver exemplo 52. A utilização de CSC-2 imobilizado indicou o mesmo tipo de taxa de recuperação e de excesso enantiomérico que os do CSC-2 livre quando se adicionava o ácido oleico. Ver exemplo 53.

A adição de um dissolvente orgânico, tal como o hexano, também indica um aumento significativo quando concentrações acrescidas de ácido oleico se encontram presentes. É útil uma concentração de 1 para 25% de ácido oleico em hexano, volume/volume. O intervalo preferencial encontra-se compreendido entre 5 e 15%. Ver exemplos 54 e 56. A observação de mais dissolventes mostrou que nem os dissolventes aromáticos (tolúeno) nem os dissolventes clorados (clorofórmio) eram benéficos. Contudo, dissolventes alifáticos tais como o hexano e o iso-octano dão taxas aumentadas significativamente. Ver exemplo 55. Uma avaliação posterior de mais dissolventes com ésteres de monoglicérido de cetoprofeno (KPG) e, etileno-glicol de cetoprofeno (KPEG) mos

traram que os dissolventes alifáticos melhoram a taxa e o excesso enantiomérico. Ver exemplo 56. Uma lipase Enzecco Rxx de C. rugosa, que parece ser a mesma que CSC-2, por IEF, possuía um peso molecular levemente mais elevado e proporcionava uma estereosselectividade bastante diferente. De um modo pouco vulgar, verificou-se uma intensificação da proporção com o ácido oleico, na hidrólise de KPEG, mas não na do KPG. Isto indica que a SDS-PAGE ou a IFE isoladamente, não são suficientes para fazer a distinção dos diferentes enzimas. Ver exemplo 57.

Pode também efectuar-se a separação da preparação enzimática da lipase MY numa escala preparatória por focalização isoelectrica e, pode obter-se CSC-1 e CSC-2 de acordo com este procedimento. Ver exemplo 58.

São do conhecimento do especialista os métodos adequados, que aqui se utilizam para se efectuar a imobilização da lipase. Ver, por exemplo, a patente de invenção norte-americana nº 4 436 813 que descreve a imobilização de enzimas ou de células que os contêm, utilizando materiais pré-poliméricos, tais como os pré-polímeros de poliazetidina (por exemplo, Polycup), os pré-polímeros de celulose carboximetilica, de isocianato de polimetileno e de hidrogel de poliuretano. Pode utilizar-se qualquer um destes materiais para os presentes objectivos, de acordo com o procedimento descrito na patente 4 436 813. Também são úteis aqui, para a imobilização do enzima, os pré-polímeros polifuncionais de aziridina terapêuticos, tais como os descritos na patente de invenção norte-americana nº 4 650 755, com o nº de Série 938 248, cujo conteúdo aqui se engloba como referência. Outros agentes de imobilização encontram-se exemplificados nos exemplos que aqui se fornecem.

Os exemplos que se seguem ilustram, mas não limitam, a presente invenção.

EXEMPLO 1

Examinaram-se as proteínas presentes nas lipases comerciais de C. rugosa, a partir de três fontes disponíveis (Meito Sangyo, Biocatalyst Ltd. e, Amano), por SDS-PAGE, para determinar as características dos pesos moleculares. Dissolveram-se as preparações enzimáticas em SDS a 1%-0,05 M de Tris a pH 8,0, mercaptoetanol a 1% numa concentração de 1 mg/ml. Analisaram-se as amostras num sistema "Phast" (Pharmacia LKB) utilizando geles de poliacrilamida pré-fabricados num gradiente compreendido entre 10-15%. Aplicou-se a proteína (0,2 µg-2,0 µg/pista) sobre o gel e deixou-se a 73 volts/hora a 15°C. Fixaram-se os geles em etanol-ácido acético e, corou-se a proteína com prata utilizando a câmara de desenvolvimento de Pharmacia.

A lipase MY (Meito Sangyo), a lipase AY (Amano) e a lipase de Candida cylindracea (Biocatalyst) possuíam, cada uma delas, uma faixa principal sobre o gel, com um peso molecular de 60 Kilodaltons, (ver fig.1) No entanto, tal como se indica na fig. 1, a Lipase AY (Pistas 2 e 5) possuíam uma outra banda principal.

Exemplo 2

Verificou-se a composição da lipase MY que se encontra comercialmente disponível, utilizando cromatografia em CM-Trisacryl e DEAE-Trysacryl. Dissolveu-se 0,33 mg de lipase MY em 10 ml de Na₂HPO₄ 0,25 mM (pH 7,9), e eliminaram-se os sólidos por centrifugação. Aplicou-se a proteína a uma coluna M de CM-Trisacryl de 2,5 X 10 cm, equilibrada com o mesmo tampão. Ajustou-se o débito para 1,0 ml/minuto. Lavou-se a resina com o mesmo tampão até que a absorvância a 280 nm fosse zero. Eluiu-se

um único pico de proteína contendo toda a actividade enzimática, utilizando esta resina de troca de iões.

Dissolveram-se 5 mg de lipase MY, em NaCl 0,15 M-
 Na_2HPO_4 0,01 M (pH 7,3) e, removeram-se os sólidos por centrifugação. Dessalinizou-se a proteína por cromatografia numa coluna de resina Sephadex G-25 com Na_2HPO_4 (pH 7,0). Agregaram-se as fracções de proteína e aplicaram-se numa coluna de DEAD-Trisacryl M de 2,5 X 10 cm equilibrada com Na_2HPO_4 25mM, a pH 7,0. Efectuou-se a eluição por lavagem da resina com o mesmo tampão. Eluiu-se toda a actividade enzimática e toda a proteína com um único pico. Tomando estes dados como ponto de partida, assumiu-se que a proteína, na preparação da lipase MY, é de uma única espécie.

Exemplo 3

Neste exemplo ilustra-se a hidrólise do éster metílico do ácido 2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico (HPPA-Me) utilizando a lipase MY.

Misturaram-se, com agitação, durante 5,5 horas, 340 mg de lipase MY (Meito Sangyo), 4 g de éster metílico de R,S-HPPA, e 200 ml de KH_2PO_4 mM (ajustado para o pH 6,5).

Efectuou-se a análise do ácido formado por extracção do éster após ajustamento da solução aquosa para pH 6,5 (ocorre uma ligeira descida de pH na hidrólise) com CH_2Cl_2 seguido de ajustamento de pH para 2 e de extracção do ácido com acetato de etilo. Evaporou-se a solução por secagem, recolheu-se em água e analisou-se por HPCL com uma coluna "Macherey Nagel-Duren Resolvosil BSA-7", utilizando n-propanol a 5% KH_2PO_4 10 mM, a pH 5, a 2,7 ml/minuto com detecção a 220 nm. Nesse momento 35% de éster de R e de S tinham-se convertido em ácido. A proporção

de ácidos foi de 94% de R e de 6% de S.

Exemplo 4

Comparação da estereosseletividade das lipases comercialmente disponíveis de C. rugosa.

Compararam-se a lipase MY (Meito Sangyo), a lipase B de Candida (Biocatalyst), Ltd.), a lipase OF (Meito Sangyo) e a lipase AY (Amano), quanto à sua estereosseletividade para a produção de R-HPPA a partir do éster metílico de R,S-HPPA. Adicionaram-se as preparações, nas quantidades indicadas no quadro I, a 50 ml de éster metílico de HPPA 20 mM em KH_2PO_4 50 mM, a pH 6,5. Incubaram-se as reacções de lipase com o substrato, com agitação, a 25°C, durante 22 horas. Determinou-se a proporção de ácido de configuração R, para ácido de configuração S por HPLC, conforme descrito no exemplo 3, numa hidrólise a, aproximadamente, 16% do éster. No quadro indicam-se os resultados.

QUADRO 1		
	mg de	% de
<u>Preparações de lipase</u>	<u>enzima adicionador</u>	<u>ácido-R</u>
Lipase MY	10,7	93
Lipase AY	10,6	93
Lipase B	9,4	69
Lipase OF	9,6	68

Conforme se indica, a lipase MY e a lipase AY demonstraram uma maior estereoespecificidade do que a lipase B ou a lipase OF.

Exemplo 5

Neste exemplo descreve-se a hidrólise a duas fases com lipase MY de HPPA-Me.

Adicionou-se lipase MY solúvel (2 g) a tolueno (50 ml)

contendo HPPA-Me 1 M (196 g/l) e 50 ml de KH_2PO_4 1 M, a pH 7,0 e deixou-se converter o éster R,S, no ácido. A proporção de ácido neste sistema bi-fásico (tolueno/água), numa hidrólise a 46% do éster R,S, foi de 92% de ácido de configuração R e de 8% de ácido de configuração S.

Exemplo 6

Optimização da hidrólise da lipase MY, em duas fases, em diversas misturas de dissolventes orgânicos /água.

Todas as reacções se levaram a efeito conforme se segue:

A. Combinou-se 75% de dissolvente orgânico/25% de tampão aquoso cinquenta miligramas de R,S-HPPA-Me, numa ampola de cintilação, com 75 ml de dissolvente orgânico, 2,5 ml de tampão de fosfato 50 mM, a pH 6,0 e 5 mg de lipase MY. Colocou-se as misturas reaccionais num agitador e agitaram-se durante um período de 0-43 horas, recolhendo-se amostras em diversos momentos.

B. Combinou-se dissolvente orgânico a 25%/ tampão aquoso a 75% cinquenta miligramas de R,S-HPPA-Me, numa ampola de cintilação de 10 ml, com 2,5 ml de dissolvente orgânico, 7,5 ml de tampão de fosfato 50 mM (pH 6,8) e 5 mg de lipase MY. Agitaram-se as misturas reaccionais durante um período de 0-143 horas sendo recolhidas amostras em diversos momentos.

Os dados do quadro 2 representam a % de conversão e a % de R-HPPA produzido utilizando os dissolventes orgânicos indicados num sistema a duas fases em que 75% do volume seco do veículo total (dissolvente) era água e o balanço (25%) eram dissolventes orgânicos.

QUADRO 2

	<u>Solvent %</u>	<u>Tempo (Hr)</u>	<u>Conversão</u>	<u>%R</u>	<u>Solubilidade</u>
			<u>éster/áci</u>	<u>%</u>	<u>(HPPA-ME)</u>
			do		mg/ml
Tetracloreto de carbono	25	2,7	58	79	33,0
	75	2,7	61	76	
1,2-dibromo-etano	25	43	33	73	565,7
	75	43	23	57	
tetracloro-etileno	25	5,3	61	83	1,4
	75	5,3	58	85	
1,1,2 tricloro-etano	25	43	29	79	558,0
tricloro-trifluoroetano	25	5,3	49	100	insolúvel
	75	2,7	60	85	
xilenos	25	5,3	49	100	
	75	5,36	41	89	
tolueno	25	2,7	385	100	236,3
	75	2,7	25	90	
acetona	25	43	0	0	nt
	75	43	0	0	nt
2-propanol	25	43	0	0	nt
	75	43	0	0	nt
cumeno	25	2,7	35	100	20,0
ciclo-hexano	25	2,7	35	100	66,4
	75	2,7	31	83	
fluoro-benzeno	25	5,3	40	95	155,5
	75	5,3	29	86	
álcool etílico	25	43	0	0	nt
	75	43	0	0	nt

Conforme se pode verificar, obtiveram-se os melhores resultados utilizando a menor quantidade de dissolvente com os hidrocarbonetos arilo ou clorofluoro-hidrocarbonetos misturados, nomeadamente, tricloro de trifluoroetano.

Exemplo 7

Neste exemplo ilustra-se a utilização da lipase MY imobilizada, na hidrólise de HPPA-Me.

Agitou-se a lipase MY imobilizada que se preparou, de acordo com os métodos seguintes, com uma solução de tolueno de HPPA-Me e de fosfato tampão (pH 6,5), à temperatura ambiente durante cerca de 60 horas. Depois, ensaiou-se a solução aquosa para se verificar a concentração de R-HPPA por HPLC, de acordo com o exemplo 3. Lavou-se o enzima com água desionizada e adicionou-se a um novo lote.

A. Imobilização da Lipase MY em "Amberlite IRC-84" ou "DP-1 com XAMA-7". Misturou-se cuidadosamente a lipase MY (1,10 g), com 2,5 g de Amberlite IRC-84 ou de Amberlite DP-1 desidratadas, 0,85 g de XAMA-7 e 2 ml de tampão de fosfato (pH 6,5, 0,1M). Deixou-se a mistura em repouso, à temperatura ambiente, durante 4 horas, período de tempo durante o qual se imobilizou o enzima. Lavou-se o agente catalítico e, depois armazenou-se a 4°C.

B. Imobilização da Lipase MY sobre "Amberlite DP-1" com "Policup". Aqueceram-se a 45°C, durante 4 horas, 0,15 g de lipase MY, 0,5 g de Amberlite DP-1 desidratada e 2 ml de Policup. Lavou-se o enzima imobilizado e ensaiou-se com HPPA-Me. A percentagem de imobilização foi de 40%.

C. Imobilização da Lipase MY sobre Gotas de Celulose Activadas por Periodato de Sódio. Agitaram-se 0,15 g de lipase MY e 1 g de gotas de celulose activadas por periodato de sódio (NaIO_4) em 5 ml de solução salina de tampão fosfato (PBS), à temperatura ambiente, durante 20 horas. Recolheu-se o enzima imobilizado, lavou-se e ensaiou-se com HPPA-Me. A percentagem da imobilização foi de 90%.

D. Imobilização da lipase MY em Chitina com Glutaraldeído. Agitaram-se 0,25 g de lipase MY, 0,5 g de chitina e 500 μl de glutaraldeído (50%) em 10 ml de PBS, à temperatura ambiente, durante 20 horas. Recolheu-se o enzima imobilizado, lavou-se e ensaiou-se com HPPA-Me. A percentagem de imobilização foi de 67%.

E. Imobilização de Lipase MY sobre Hexanodiamina - Gotas de Celulose com Glutaraldeído. Agitaram-se 0,25 g de lipase MY 1 g de gotas de hexanodiamina-celulose e 500 μl de glutaraldeído (50%) em 5 ml de PBS, à temperatura ambiente, durante 20 horas. Recolheu-se o enzima imobilizado, lavou-se e ensaiou-se com HPPA-Me. A percentagem de imobilização foi de 54%.

F. Imobilização da Lipase MY em Poli-etileno-imina (PEI) - gotas de Celulose com Glutaraldeído. A preparação de PEI-gotas de celulose consistiu em misturar 10 g de gotas de celulose desidratada, 3 g de PEI (50%), 2 g de cloreto cianúrico e 2,5 ml de trietilamina, em 20 ml de acetonitrilo a 40°C, durante 15 horas. Depois recolheram-se as gotas e lavaram-se com 200 ml de HCl 0,01 N, 200 ml de metanol, 200 ml de NaOH 0,05 N, 200 ml de metanol e 200 ml de água desionizada. Imobilizou-se a lipase MY (0,25 g) agitando 2 g de PEI- gotas

de celulose e 500 μ l de glutaraldeído (50% em 10 ml de PBS, à temperatura ambiente, durante 24 horas. Recolheu-se o enzima imobilizado, lavou-se e ensaiou-se com HPPA-Me. A percentagem de imobilização foi de 71%.

G. Imobilização da lipase MY em PEI-gotas de celulose com carbo-di-imida. Agitaram-se 0,25 g de lipase MY, 1 g de PEI-gotas de celulose (do ponto F, anterior) e 0,25 g de carbo-di-imida em 10 ml de PBS a 4°C, durante 65 horas. Recolheu-se o enzima imobilizado, lavou-se e ensaiou-se com HPPA-Me. A percentagem de imobilização foi de 34%.

H. Imobilização da lipase MY em PEI-gotas de celulose (do ponto F, anterior) com 2,4-di-isocianato de tolueno. Agitou-se 0,25 g de lipase MY, 1 g de PEI-gotas de celulose e 2,4-di-isocianato de tolueno (10 mg), em 5 ml de PBS à temperatura ambiente, durante 20 horas. Recolheu-se o enzima imobilizado, lavou-se e ensaiou-se com HPPA-Me. A percentagem de imobilização foi de 4,4%.

Exemplo 8

Neste exemplo ilustra-se o efeito dos agentes redutores na estabilização da lipase, na presença de HPPA.

Levou-se a efeito a hidrólise assimétrica de HPPA-Me num sistema bifásico aquoso-orgânico, utilizado no exemplo 5. O éster encontrava-se, predominantemente na fase orgânica enquanto que o enzima e o ácido se encontravam, predominantemente na fase aquosa.

Avaliou-se o efeito do hidrossulfito de sódio (quadro 3), sulfito de sódio (quadro 4), cistina (quadro 5) e de diversos outros agentes redutores (quadro 6). O hidrossulfito de sódio foi eficaz na prevenção da perda de actividade do en-

zima. Nem o sulfato de sódio, nem a cistina foram eficazes na prevenção da perda da actividade enzimática.

Imobilizaram-se 5,0 g de lipase MY sobre 10 g de Amberlite DP-1 com 2,5 g de XAMA-7. Agitaram-se 0,89 g do enzima imobilizado (eq. a 150 mg de enzima impuro) com 2,5 ml de HPPA 1M (fosfato, a pH 6,5) contendo 2,4, 8 e 16 mg/ml de reagentes redutores, durante 4 dias. Ensaaiaram-se a cistina o hipofosfito de sódio, o boro-hidreto de tetra-butil-amónio, o ciano-boro-hidreto, o sulfito de sódio e o hidrossulfito de sódio. Depois, lavou-se o enzima imobilizado com água desionizada e ensaiou-se com HPPA-Me. Utilizou-se o enzima imobilizado não tratado como controlo, para calcular a actividade residual do enzima tratado com HPPA. A lipase tratada com HPPA conservou 70% da actividade quando não se utilizaram reagentes redutores.

QUADRO 3

Lote <u>#</u>	Tempo de reação (hrs)	HPPA-Me Conc. (mMole)	Na ₂ S ₂ O ₄ (mg)					
			<u>0</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>25</u>	<u>50</u>

Conversão (%) de HPPA-Me para HPPA

1	15	10	33	37	36	30	25	24
3	15	10	25	29	29	31	21	17
7	15	10	20	30	27	25	25	25
11	15	10	13	21	24	31	34	33
14	15	10	19	21	22	21	23	23
18	15	10	18	16	17	19	29	33
22	15	10	12	14	13	13	18	23
30	15	10	13	17	17	17	31	38

(1) Imobilizaram-se 180 mg de lipase MY, sobre 2 ml de IRC-84 com 90 mg de XAMA-7, de acordo com o procedimento do exemplo 7A.

(2) HPPA-Me/Tolueno = 1 M/10 ml, pH 7 de fosfato tampão 0,25 M X 20 ml.

QUADRO 4

Lote	Tempo de	HPPA-Me	Na ₂ SO ₃ (mg)					
#	reação	Conc.						
	(hrs)	(mMole)	0	2,5	5	10	25	50

Conversão (%) de HPPA-Me para HPPA

33	15	10	28	39	20	26	32	25
7	15	10	13	17	14	20	17	25
9	15	10	13	14	11	16	13	18
12	15	10	14	16	12	14	12	18
14	15	10	13	13	9	13	10	16
18	15	10	16	14	10	14	12	12
19	15	10	13	13	11	15	12	13
20	15	10	14	14	10	14	11	14

1) Imobilizaram-se 200 mg de lipase MY em 2 ml de IRC-84 com 100 mg de XAMA-7, de acordo com o procedimento do exemplo 7, parte A.

2) HPPA-Me/Tolueno = 1 M/10 ml, pH 7 de fosfato tampão 0,25 M X 20 ml.


QUADRO 5

Lote <u>#</u>	Tempo de reacção <u>(hrs)</u>	HPPA-Me Conc. <u>(mMole)</u>	Cistina (mg)				
			<u>0</u>	<u>2,5</u>	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>25</u>
1	15	10	36	30	34	35	36
5	15	10	27	-	31	28	26
9	15	10	14	19	11	16	16
15	15	10	17	19	17	16	17
16	15	10	19	17	16	15	13
20	15	10	19	16	16	17	16
21	15	10	15	20	18	15	17
22	15	10	17	20	17	17	17

- 1) Imobilizaram-se 240 mg de lipase MY em 2 ml de IRC-84 com 120 mg de XAMA-7, de acordo com o procedimento fornecido no exemplo 7, parte A.
- 2) HPPA-Me/Tolueno - 1 M/10 ml , pH 7 de fosfato tampão 0,25 M X 20 ml.


QUADRO 6

	Conc. <u>(mg/ml)</u>	Actividade relativa <u>%</u>
cistina	2	83
	4	76
	8	81
	16	83
NaH ₂ PO ₂	2	84
	4	81
	8	91
	16	91
Bu ₄ N CNBH ₃	2	83
	4	81
	8	88
	16	85
Bu ₄ N BH ₄	2	-
	4	-
	8	78
	16	79
Na ₂ SO ₃	2	95
	4	101
	8	110
	16	111
Na ₂ S ₂ O ₄	2	-
	4	-
	8	111
	16	112
Enzima de Controlo a 100%		
Enzima tratado com HPPA a 70,4%		

Exemplo 9

Neste exemplo ilustra-se o acréscimo da enantio-selectividade da lipase My imobilizada obtido com um acréscimo de utilização.

Combinaram-se 20 gramas de lipase MY impura (Meito Sagyo Ltd) com 20 ml de tampão de acetato de amónio 25 mM, a pH 6,5 e agitou-se fortemente durante 10 minutos. Adicionaram-se, então, lentamente, dez gramas de pré-polímero de poliaziridina, XAMA-7 (Cordova Chemical Co), e agitou-se a mistura durante 1 minuto. Adicionaram-se à mistura quarenta gramas de resina de permuta de iões Amberlite DP-1 (Rhom-Haas), com agitação constante, durante um período de 1 minuto. Deixou-se em repouso durante 12 horas, a 4°C para se completar a polimerização. Lavaram-se com tampão de acetato de amónio 25 mM, a pH 6,5 as gotas livres resultantes que fluíram, e que compreendiam Amberlite coberta com poliaziridina e, que transportavam a lipase imobilizada. Recuperaram-se 160 mililitros de lipase MY catalítica imobilizada.

Efectuou-se uma série de reacções por lotes, utilizando este agente catalítico imobilizado. Cada lote consistia em 2 moles de propionato de R,S-metil-2-(4-hidroxifenoxi), (HPPA-Me), 14 moles de tolueno, 214 moles de água desionizada (DI), 2 moles de acetato de amónio e 0,017 moles de ditionito de sódio. Ajustou-se o pH para 6,5 utilizando ácido fosfórico. Agitou-se a mistura reaccional durante 12 horas para assegurar a solubilização completa de HPPA-Me antes de se adicionar a lipase MY imobilizada.

Adicionou-se a lipase MY ao substrato e continuou-se a agitar até a hidrólise atingir a produção de, pelo menos,

0,8 moles de ácido HPPA. Recolheram-se periodicamente amostras da fase aquosa e analisaram-se, tal como se indica no exemplo 3. Quando a conversão de HPPA-Me em HPPA atingiu 40% (800 mMo-les de HPPA produzidas) eliminaram-se as gotas de enzima por filtração e introduziram-se num novo lote de substrato.

Os resultados analíticos, no termo da reacção, indicam-se a seguir, em oito lotes separados, que decorreram sucessivamente utilizando a mesma lipase MY imobilizada.

QUADRO 7

<u>Lote #</u>	<u>Tempo de</u> <u>Hidrólise (h)</u>	<u>Hidrólise</u> <u>total (M)</u>	<u>%</u> <u>R-HPPA</u>	<u>%</u> <u>S-HPPA</u>
1	120	1	82	18
2	130	1	90	10
3	140	1	91	9
4	90	0,88	98	2
5	95	0,80	98	2
6	140	0,8	99	2
7	100	0,8	100	0
8	100	0,8	100	0

Como se torna evidente, a partir dos dados anteriores, a estereosseletividade da lipase MY imobilizada aumentou de modo uniforme com a utilização ao longo dos oito lotes enquanto que a actividade da lipase MY imobilizada (% de hidrólise) decresceu um pouco. Deste modo, a hidrólise dos primeiros lotes de HPPA-Me para HPPA originou a produção de 82% de R-HPPA e de 18% de S-HPPA, enquanto que na hidrólise do sétimo e oitavo lotes a conversão foi de 100% de R-HPPA e de 0% de S-HPPA. Embora

a actividade decrescesse levemente, isso não constitui uma desvantagem. O factor importante reside no aumento de este-reoespecificidade, uma vez que um processo industrial necessi-ta duma percentagem de ee superior a 95%.

Exemplo 10

Neste exemplo descreve-se a focalização isoelétrica da lipase de Candida rugosa, para determinar as suas caracte-risticas de composição.

Examinaram-se por focalização isoelétrica (FIE) para determinar as características de composição, amostras de lipa-se de Candida rugosa, comercialmente disponível, na Meito Sangyo, Biocatalyst Ltd e Amano. Efectuou-se uma separação da proteína com base na carga de rede, utilizando FIE num sistema Phast (Pharmacia LKB) utilizando geles IEF previamente fabricados, pI's 3-9. Dissolveram-se as preparações de enzimas em água dia-lizada, 3 horas antes da FIE. Aplicaram-se 0,1 μ g-2,0 μ g de proteína/pista, sobre o gel e fez-se percorrer por 590 volts-hora, a 15°C. Fixaram-se os geles com ácido tricloroacético a 10% e depois corou-se a proteína com prata utilizando uma câma-ra de desenvolvimento Pharmacia. Determinaram-se os pI's dos enzimas por comparação com diagramas com pI's conhecidos.

A lipase MY (Meito Sangyo) e a lipase AY (Amano) apre-sentaram características muito semelhantes (fig. 2). Cada uma delas possuía 4 bandas principais de proteína, uma com um pI de 5,5, duas com pI's próximos de 4,0 e uma com um pI próximo de 3,5. A lipase OF (Meito Sangyo) e a lipase de Candida rugosa (Biocatalyst) possuíam características diferentes com 4-5 ban-das de proteínas com pI's próximos de 4,0. Estas preparações não possuíam a banda de enzima com um pI próximo de 5,5.

Exemplo 11

Neste exemplo descreve-se o fraccionamento da lipase MY da Candida rugosa (Cromatografia SP-trisacryl) em duas fracções de isózymas.

Dissolveu-se um grama de lipase MY (Meito Sangyo) em 60 ml de água e dializou-se contra 2 litros de NaH_2PO_4 0,025 M, a pH 3,3, durante 16 horas. Eliminou-se o material insolúvel por centrifugação e reagustou-se o pH para 3,3. Preparou-se uma coluna de permuta iónica de 2,5 X 20 cm de SP-Trisacryl (IBF Biotechnics) equilibrada com NaH_2PO_4 0,025 M (tampão inicial). Aplicou-se a lipase solúvel sobre a coluna e eluiu-se da resina o material que não se ligou com o tampão inicial. Levou-se a efeito uma separação da fracção de lipase (isózymas), com um gradiente de pH passo a passo, utilizando tampão de citrato de sódio 0,007 M fosfato de sódio 0,015 M. Efectuou-se a eluição utilizando o acima referido tampão de citrato-fosfato a pH 4,75 para eluir a actividade enzimática, CSC-2, com lavagens contínuas até que o A_{280} voltasse à linha de base. Eluiu-se, então uma fracção de lipase, CSC-1 com 150 ml de tampão de citrato-fosfato, a pH 6,80. As características de eluição da proteína encontram-se na fig. 3. Todas as proteínas que continham fracções foram submetidas a FIE (fig.4). O CSC-1 possuía um PI de aproximadamente 5,5, enquanto que CSC-2 possuía um pI de, aproximadamente 4,4.

Exemplo 12

Neste exemplo descreve-se a preparação de lipase estereoespecífica de Candida rugosa utilizando cromatografia em SP-Sephadex.

Dialisou-se 1,3 mg de lipase MY (Meito Sangyo) em

60 ml de água disionizada contra 2 litros de citrato 7mM-
-Na₂HPO₄ 15 mM, a pH 3,3. Ajustou-se para 3,3 o pH da solução
do enzima impuro antes de se efectuar a cromatografia colocou-
-se a proteína numa coluna Sephadex de 2,5 X 20 cm equilibrada
com o tampão anterior citrato - Na₂HPO₄ a 60 ml/hora, a 25°C.
Lavou-se a coluna com 120 ml do mesmo tampão. Efectuou-se uma
eluição, passo a passo, com os tampões de pH aumentado. Em pri
meiro lugar, eluiu-se a coluna com 100 ml de citrato 7 mM -
Na₂HPO₄ 15 mM, a pH 4,7 para se obter a CSC-2 de lipase (fig.5).
Depois, eluiu-se a coluna com 100 ml de citrato 7 mM-Na₂HPO₄
15 mM a pH, 6,8. Este tampão eluiu uma fracção que continha a
fracção do enzima designada por CSC-1.

Com base na análise de focalização isoelectrica sobre
um gel de FIE 3-9, cada uma destas fracções da coluna continha
uma única banda principal de proteína. A banda eluida com tam
pão a pH 4,7 possuía um pI de 4,4 e designou-se por CSC-2. A
banda que se eluiu a pH 6,8 possuía um pI de 5,2 e designou-se
por CSC-1.

Exemplo 13

Composição aminoácida e análise de sequenciação dos
isózymas CSC-1 e CSC-2, de acordo com o obtido a partir da li
pase de Candida rugosa.

O procedimento de purificação para CSC-1 e CSC-2 exi
ge uma solubilização inicial de lipase MY a 50 g/litro em fos
fato dibásico de sódio 25 mM (pH final de 6,5). Decorridas 2-3
horas de agitação a 4°C, centrifugou-se a amostra (10 000 rpm,
10 minutos) e pôs-se de parte o sedimento. Fez-se baixar o pH
de um dos sobrenadantes para 3-3,2 com ácido fosfórico e dia
lisou-se o sobrenadante num dispositivo oco de fibra ou dessa-

linizou-se numa coluna GF-05 de Trisacryl, equilibrada com fosfato monobásico de sódio 25 mM, a pH 3,2. Depois, carregou-se a amostra numa coluna SP-Trisacryl equilibrada a pH 3,2. Lavou-se, então a coluna (25 mM, pH 3,2) e eluiu-se sequencialmente com tampão de citrato/fosfato de sódio a pH 4,8 e a pH 6,8 (tampões McIlvaine, 25 mM, aproximadamente). Todos os tampões continham 0,02% de azida de sódio. Podiam substituir-se os sistemas de tampões anteriores por acetato de sódio 25 mM, com ajustamento de pH, utilizando ácido acético. É também possível efectuar um tampão e uma troca de pH numa coluna Trisacryl GF05. Esta coluna podia também tratar-se com água destilada. Descobriu-se que as bandas predominantes de enzimas se encontravam localizadas em geles SDS-PAGE Phast a 55 000-60 000 MW. Esta banda é bastante difusa, e caracterizou-se melhor utilizando a focalização isoleléctrica (FIE). Os geles de FIE que percorriam o sistema Phast (pH compreendido entre 3-9) revelaram que os enzimas (CSC-2) no pico de eluição a pH 4,8 (primeiro), possuíam um pI de aproximadamente 4,4, enquanto os de CSC-1 possuíam um pI mais alcalino (aproximadamente 5,2). Visualizaram-se estas bandas no topo (extremo ácido) do gel (CSC-2) ou próximo do meio (CSC-1). Verteram-se os geles de FIE num protocolo de um sistema Phast normalizado, utilizando um máximo de 2 000 volts, 3,5 watts e um total de 500 volts-hora.

Purificaram-se, posteriormente as amostras de CSC-1 e de CSC-2 por concentração num dispositivo oco de fibra (CD Laboratories) e/ou por uma segunda cromatografia em SP-Trisacryl, no caso de CSC-2. O CSC-1 preparado, deste modo consistia numa banda principal sobre geles de FIE. O CSC-2 continha 4 ou mais bandas, tal como se tornou evidente, de acordo com todas as

bandas acídicas muito próximas na lipase MY. A amostra de CSC-2 utilizada continha uma banda predominante. A fotografia do gel (fig.6) representa um gel Phast de FIE a pH 3-9, que se fixou com ácido tricloroacético e que se revestiu com prata. Diluíram-se todas as amostras em água destilada e carregaram-se sobre o gel a 1 microlitro por pista. As pistas 1 e 8 eram pI de FIE normalizados. Estas proteínas normalizadas e os seus pontos isoelétricos eram amilóglucosidase (3,5), corante vermelho de metilo (3,75), inibidor da tripsina de soja (4,55), beta-lactoglobulina A (5,2), anidrase carbónica B de bovino (5,85), anidrase carbónica B humana (6,55), mioglobulina de equino (6,85 e 7,35), lectina de lentilha (8,15, 8,45 e 8,65) e tripsinogénio (9,3). As pistas 2 e 3 são amostras de lipase MY (sem dessalinização/purificação). As pistas 4 e 5 eram de CSC-1 e as pistas 6 e 7 eram de CSC-2. Uma vez que não se conheciam os coeficientes de extinção das proteínas nas amostras, e a absorvância a 280 nm era artificialmente elevada devido à interferência de cromóforos, calculou-se o teor de proteínas adicionando 100 μ l de soluções de proteínas a 3 ml de reagente de Pierce e determinou-se o DO a 595 nm, após 10 minutos (o espectrofotómetro não apresentou resultado com reagente). Deste modo, 50 mg de lipase MY em 1 ml de água proporcionaram um DO de 595 de 0,4 ($\sim$ 400 μ g/ml), ou ($\sim$ 1,8% de proteína). 1,2 mg de CSC-2 em 1 ml de água proporcionaram um DO 595 de 0,34 ($\sim$ 340 μ g/ml, ou $\sim$ 28% de proteína).

No quadro 8 apresenta-se a composição aminoácida de CSC-1 e de CSC-2.

QUADRO 8

Análise Aminoácida de CSC-1 e de CSC-2

<u>Aminoácidos</u>	<u>% Composição</u>	
	CSC-1	CSC-2
Alanina	9,57	8,05
Arginina	3,62	3,5
Acido Aspártico/ Asparagina	11,29	12,8
Cistina/2	N.D.	N.D
ácido glutâmico/ /Glutamina	10,76	10,6
-Glicina	9,7	10,3
-Histidina	1,78	1,39
-Isoleucina	4,6	4,46
-Leucina	7,9	8,3
Lisina	4,5	4,38
Metionina	1,58	1,99
Fenilalanina	4,3	5,0
Prolina	3,0	6,59
Serina	10,9	7,9
Treonina	7,0	6,2
Triptofano	N.D.	N.D.
Tirosina	3,49	3,38
Valina	5,79	4,9

* Hidrólise de 6N-HCl/0,05% mercaptoetanol durante 20 horas 115⁰C; adicionou-se um cristal de fenol antes da hidrólise do ácido. Aumentou-se a serina em 10% e a teonina de 5% para compensar a destruição pelo ácido. N.D. não determinada.

Purificou-se, posteriormente uma amostra de CSC-1, numa coluna C4 de fase inversa e num sistema dissolvente de ácido trifluoroacético a 0,07% em água, ácido trifluoroacético a 0,7% em acetonitrilo. No sistema de eluição obtiveram-se as proteínas por gradiente de 20-50% de acetonitrilo. Resolveu-se CSC-2, de modo idêntico, por um gradiente de acetonitrilo de 45-75% nas mesmas condições de CSC-1. Depois, separaram-se CSC-1 e CSC-2 por electroforese, transferiram-se para um filtro PVDF (Millipore) e efectuou-se a sequenciação da banda que migrou a 60 000 daltons. Não, é possível estabelecer com certeza a posição 10 de CSC-1, embora deva tratar-se de um triptofano, que se torna difícil identificar nas condições de sequenciação, devido, possivelmente a uma carboximetilação incompleta.

As composições dos novos isóenzimas, CSC-1 e CSC-2, encontram-se ilustradas pelas sequências aminoácidas da extremidade N, conforme se segue:

CSC-1

1	5	10
Ala-Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-(?)		
11	15	20
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn		
21	25	30
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-		
31	35	
Pro-Pro-Val-Gly-Asn-		

CSC-2

1	5	10
Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp		
11	15	20
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-		

21 25 30
 Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-X-X-Ala-Glu
 31 35 39
 Pro-Pro-X-X-Asn-Leu-Phe-Ile-Leu

Observou-se uma grande homologia sequencial entre CSC-1 e CSC-2 uma vez que estas enzimas apenas diferem nas posições 5 e 10 tanto quanto se sabe, habitualmente, das suas sequências.

Também se verificou que existe uma grande homologia sequencial de CSC-1 e acetil-colinesterase (AcEs) de Torpedo Californica, como se demonstra a seguir:

			4
<u>CSC-1</u>		Ala-Pro-Thr-Ala	
AcEs	Asp-His-Ser-Glu-Leu-Leu-Val-Asn-Thr-Lys-		
	1		10
	5	10	14
CSC-1	Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-(?)-Thr-Ile	Thr-Gly-	
AcEs	Ser-Gly-Lys-Val-Met-Gly-Thr-Arg-Val-Pro-		
	11		20
	15	20	24
CSC-1	Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-Glu-Ala-Phe-Leu-		
AcEs	Val-Leu-Ser-Ser-His-Ile-Ser-Ala-Phe-Leu-		
	21		30
	25	30	34
CSC-1	Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-Pro-Pro-Val-Gly-		
AcEs	<u>Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-Pro-Pro-Val-Gly-</u>		
	31		40
	35		
CSC-2	Asn-		
AcEs	<u>Asn-</u>		
	41		

No entanto, a acetilcolinesterase de T. californica não hidrolisa estereosseletivamente HPPA-Me- em R-HPPA no ensaio que se segue. Combinaram-se 200 mililitros de KH_2PO_4 (pH 6,5) com 400 mg de HPPA-Me e 500 unidades de acetilcolinesterase de T. californica. Agitou-se a mistura reaccional durante 24 horas e, depois analisaram-se as amostras, tal como no exemplo 3. Observou-se uma actividade hidrolítica muito fraca.

Exemplo 14

Separação em larga escala de isózymas de lipase MY, utilizando SP-trisacryl.

Equilibrou-se uma coluna LS de SP-Trisacryl de 10 X 25 cm, com NaH_2PO_4 25 mM (pH 3,0), (tampão A). Dissolveram-se 150 mg de lipase MY impura (Meito Sangyo), em 3,0 litros de NaH_2PO_4 25 mM (pH 6,5), durante 2 horas. Centrifugou-se a suspensão a 10 000 X g, durante 20 minutos. Ajustou-se o pH da fracção solúvel para 3,0 com H_3PO_4 5N. Filtrou-se a solução enzimática e dialisou-se durante 3 horas contra 100 volumes de água desionizada. Verteu-se a solução enzimática numa coluna de permuta de iões a 1,25 L/hora. Lavou-se, o material que não se ligou, através da coluna com tampão A. Efectuou-se uma eluição de pH em duas fases, primeiro com 5 litros de ácido cítrico 7 mM - Na_2HPO_4 15 mM (pH 4,8), seguida de 5 litros de ácido cítrico 7 mM - Na_2HPO_4 15 mM, a pH 6,80. Indica-se na fig. 7 o cromatograma resultante. Agregou-se o primeiro pico da proteína (pH 6,80) eluído pelo tampão, concentrou-se por ultrafiltração num dispositivo de fibra oco (Amicon). A partir desta coluna recuperou-se um total de 1,35 mg de lipase CSC-1. Verificou-se por FIE, que esta proteína era idêntica à CSC-1 de lipase produzida no

exemplo 11.

Exemplo 15

Hidrólise do éster metílico de HPPA com CSC-1 de lipase.

Hidrolisou-se, a 25°C, o éster metílico de R,S HPPA (25 mM) em 25 ml de Na₂HPO₄ 50 mM, a pH 6,5, com 50 µg de enzima CSC-1 de lipase (a partir do exemplo 11). Após uma hora de reacção, recolheu-se uma amostra e, analisou-se por cromatografia líquida a alta pressão, em que se separaram as formas R e S dos ácidos e se determinou a respectiva concentração. Utilizou-se uma coluna analítica (150 X 4 mm) Resolvosil-BSA-7 (Macherey-Nagel) com KH₂PO₄ 10 mM, a pH 5,0, e n-propanol a 5%, como a fase móvel a 2,0 ml/minuto. Nesse momento a reacção continha ácido de configuração R, 2,9 mM e não se detectava ácido de configuração S. Deixou-se prosseguir a reacção até a uma conversão de 46% do éster racémico, sendo nesse momento a proporção de ácidos formados de 97% de ácido de configuração R e de 3% de ácido de configuração S.

Exemplo 16

Hidrólise do éster etílico de HPPA com CSC-1 isento de lipase

Hidrolisaram-se 25 ml de éster etílico de R,S HPPA (20 mM), em Na₂HPO₄ 50 mM, a pH 6,5, a 25°C, com um lmg do enzima CSC-1. Após uma hora de reacção, recolheu-se uma amostra e analisou-se por cromatografia líquida de alta pressão para determinar a concentração dos ácidos R e S. Utilizou-se uma coluna analítica (150 X 4 mm) Resolvosil-BAS-7 (Macherey-Nagel), e utilizou-se KH₂PO₄ 10 mM (pH 5,5) e n-propanol a 5% como fase móvel a 2,0 ml/minuto. Decorrida uma hora, ocorrera uma hidrólise de 30% do éster racémico e a pureza enantiomérica do

ácido produzido era de 98% para o ácido de configuração R e de 2% para o ácido de configuração S.

Exemplo 17

Comparação da hidrólise de éster metílico de HPPA por CSC-1 e por CSC-2.

Colocaram-se dentro de dois balões de Erlenmeyer de 100 ml, vinte e cinco ml de tampão HPPA-Me 25 mM/ KH_2PO_4 100 mM (pH 6.5). Colocou-se CSC-1 num balão (uma fracção de 50 μl eluída a partir da coluna de SP-Trisacryl, exemplo 11) e noutro balão, colocou-se CSC-2 (uma fracção de 50 μl , fracção eluída a partir da coluna de SP-Trisacryl, exemplo 11). Recolheram-se amostras das misturas reaccionais conforme se indica a seguir e analisaram-se, tal como no exemplo 3, dando origem aos seguintes resultados:

QUADRO 9

<u>Tempo</u> (Hr)	CSC-1		CSC-2	
	<u>Conversão</u> %	<u>%R-HPPA</u>	<u>Conversão</u> %	<u>%R-HPPA</u>
1	4	100	5	97
2	11	100	7	96
3	17	100	8	97
5	25	99	13	96
22	52	97	40	93
30	-	-	49	91

Tal como se indica, a percentagem de conversão do éster metílico de HPPA, racémico, foi substancialmente elevada para CSC-1. A pureza enantiomérica do produto obtido com CSC-1

foi também superior, em comparação com a que se obteve com CSC-2, embora proporcionassem ambos resultados úteis.

Exemplo 18

Neste exemplo, faz-se a comparação dos resultados que se obtiveram por hidrólise de ésteres de cetoprofeno utilizando CSC-2 e lipase MY impura.

Adicionaram-se a uma solução de 9 ml de fosfato de amónio 100 mM, (pH. 5,5) em balões de Erlenmeyer de 50 ml, uma determinada quantidade de éster (quer directamente ou dissolvida em 200 μ l de DMF). Adicionou-se uma solução da quantidade determinada de enzima em 1 ml do mesmo tampão. Agitou-se a mistura num misturador rotativo, a 250 rpm, a 35°C, durante 22 horas. Acidificou-se a mistura reaccional com 8 gotas de HCL 6 (N) a pH 1,5-2,0 extraíu-se com CHCl_3 (2 X 10 ml). Analisou-se a solução de CHCl_3 por cromatografia líquida de alta pressão, (CLAR) para se determinar a percentagem de ácido produzido na hidrólise. Secou-se o extracto de CHCl_3 (5 ml) da mistura reaccional de hidrólise sobre Na_2SO_4 anidro e filtrou-se. Arrefeceu-se o produto resultante da filtração até 0°C em frascos rolhados e adicionaram-se 100 μ l de N-metilmorfolina, seguidos de 100 μ l de cloroformato de isobutilo. Após ter-se agitado lentamente a 0°C, durante 10 minutos, adicionaram-se 100 μ l de D-(+)-1-feniletilamina e continuou-se a agitar lentamente a 0°C durante 5 minutos. Agitou-se então a mistura reaccional à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Lavou-se a mistura reaccional com água (5 ml), HCL 1 (N) (5 ml) e, novamente com água (5 ml). Analisaram-se, então as amidas diastereoméricas produzidas, por CLAP numa coluna, como se fez especialmente notar, para se determinar o ee (%S-%R) do ácido produzido por

hidrólise enzimática dos ésteres.

Hidrolisaram-se os ésteres de cetoprofeno (50 mg) tal como anteriormente descrito. Efectuaram-se as análises por CLAP para a quantidade de ácido produzida pela hidrólise dos ésteres monoglicerídico e etilenoglicólico de cetoprofeno, numa coluna (9,4 mm X 100 mm, Whatman), Partisil 5 ODS-3 RAC utilizando $\text{CH}_3\text{OH} : (\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (60:40), a 4 ml/minuto e, monitorizando a 254 nm. Efectuaram-se as análises de CLAP do ácido produzido por hidrólise de outros ésteres, numa coluna ODS-3 RAC, utilizando $\text{CH}_3\text{OH} : (\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (80:20) a 2 ml/minuto e monitorizando a 254 nm. Determinou-se o excesso enantiomérico do cetoprofeno produzido por cada hidrólise, por análise das amidas por CLAP numa coluna ODS-3 RAC, utilizando-se $\text{CH}_3\text{OH} : (\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (60:40) a 4 ml/minuto e efectuando-se a monitorização a 254 nm. Os resultados encontram-se no quadro a seguir.

QUADRO 10

Resultados da Hidrólise de Diversos Esteres de Cetoprofeno com CSC-2 e Comparação dos Resultados com os da Lipase MY Bruta.

<u>Ester</u>	<u>Enzima</u>	<u>Reacção</u> <u>em</u>	<u>Proporção</u> $\mu\text{mmole/}$ <u>h/mg</u>	<u>ee do</u> <u>S-ácido</u> <u>(%)</u>
metílico	Lipase MY	tampão	0,002	36
	CSC-2	tampão	0,222	96
n-butílico	Lipase MY	tampão	0,005	88
	CSC-2	tampão	0,519	> 99
	CSC-2	duas fases*	0,314	> 99
n-octílico	Lipase MY	tampão	0,004	94
	CSC-2	tampão	0,192	ND
	CSC-2	duas fases*	0,069	ND
2-cloroetilico	Lipase MY	tampão	0,014	32
	CSC-2	tampão	1,405	98
	CSC-2	duas fases*	2,735	98
2,2,2-trifluoroetilico	Lipase MY	tampão	0,023	15
	CSC-2	tampão	2,931	78
	CSC-2	duas fases*	1,855	81
monoglicerílico	Lipase MY	tampão	0,034	77
	CSC-2	tampão	2,079	98
	CSC-2	duas fases*	3,815	ND

* Iso-octano -100 mM $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 5,5) (1 : 1) sistema de duas fases.

ND = Não determinado

Como é evidente, obtiveram-se valores de e e, proporções de hidrólise muito melhores, utilizando CSC-2, em comparação com os valores obtidos com a lipase MY, na hidrólise dos ésteres de cetoprofeno.

Este exemplo também indica resultados úteis (por exemplo, proporção e e elevados) quando se utiliza um sistema bi-fásico, que incluía iso-octano.

Exemplo 19

Neste exemplo faz-se a comparação dos resultados que se obtiveram na hidrólise do monoglicerido de cetoprofeno, utilizando lipase MY impura, CSC-1 e CSC-2.

A uma solução de 9 ml de tampão de fosfato de amónio 100 mM (pH 5,5), adicionaram-se 50 mg de monoglicerido de cetoprofeno directamente ou dissolvido em 200 μ l de DMF, seguida de uma solução de enzimas em 1 ml do mesmo tampão. Após ter-se agitado, a 250 rpm, a 35°C, durante 22 horas, acidificaram-se as misturas reaccionais e extraíram-se com clorofórmio (2 X 10 ml) e, analisa-ram-se por CLAP, para se determinar a quantidade de ácido produzida e, analisou-se, tal como descrito no exemplo 18. Indi-
cam-se a seguir, os resultados.

QUADRO 11

Resultados da Hidrólise do Monoglicerido de Celoprofeno

<u>DMF</u>	<u>Enzima</u>	<u>Percentagem de ácido</u>	<u>Percentagem</u>			
			<u>de Acido a</u>	<u>EE do</u>	<u>Calc.EE</u>	<u>do S-aci</u>
			<u>partir da</u>	<u>Propor_</u>	<u>S-áci</u>	<u>do S-aci</u>
			<u>Hidrólise</u>	<u>ção</u>	<u>do(%)</u>	<u>do (%)</u> *
200 ul	Sem Enzima	0,3				
0 ul	Sem Enzima	0,4				
200 ul	Lipase MY (50 mg)	28,3	28,0	0,039	75,2	76,0
0 ul	Lipase MY (50 mg)	27,2	26,8	0,037	68,0	69,0
200 ul	CSC-2 (1 mg)	21,3	21,0	1,455	95,4	96,6
0 ul	CSC-2 (1 mg)	27,7	27,3	1,891	96,4	97,8
200 ul	CSC-1 (1 mg)	3,6	3,3	0,229	74,6	81,0
0 ul	CSC-1 (1 mg)	4,5	4,1	0,284	84,6	92,6

. Calculado por subtracção das formas R e S de ácido presentes no material de partida com impurezas

Os resultados indicam que é preferível utilizar CSC-2 com o monoglicerido de cetoprofeno, devido à sua proporção de hidrólise substancialmente superior e melhor excesso enantiomérico (ee).

Exemplo 20

Efeito da dimetil-formamida (DMF) na hidrólise.

Efectuou-se a hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno (50 mg) em diversas misturas de tampões (pH 5,5), DMF - $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 100 mM. Adicionou-se a cada balão uma solução de

monoglicerido de cetoprofeno (50 mg) em DMF (200 μ l). Adicionou-se DMF, seguido de uma solução tampão de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 100 mM. Adicionou-se uma solução de 1 mg de CSC-2 purificado, em 0,5 ml de tampão. Decorridas 22 horas, acidificam-se amostras de DMF a 2%, 5% e 10%, extraíram-se com CHCl_3 (2 X 10 ml) e analisaram-se. As outras amostras analisaram-se directamente, tal como se descreveu no exemplo 18. O ácido produzido decresceu com o aumento da quantidade de DMF.

<u>% DMF</u>	<u>% ácido</u>
2	23
5	18
10	11
20	3
30	0,7
40	0,3
50	0,4

Exemplo 21

Hidrólise em grande escala de monoglicérido de cetoprofeno.

Adicionou-se, a uma solução de 100 mg de CSC-2 em 500 ml de tampão de fosfato de amónio 100 mM (pH 5,5), em balões de Fernbach de 2 litros, uma solução de 10 g de monoglicerido de cetoprofeno em 10 ml de DMF. Após agitação, num misturador rotativo a 300 rpm, a 35°C, durante 166 horas, ajustou-se a mistura reaccional para pH 10, com NaOH 1 M e extraíu-se com acetato de etilo (3 X 500 ml) para eliminar a fracção neutra (contendo o éster de cetoprofeno). Acidificou-se a camada aquosa (contendo ácido cetoprofénico) para pH 1,5 com HCl 6 N e, extraíu-se com acetato de etilo (3 X 500 ml). A eliminação

dos dissolventes do éster e do ácido, proporcionou, respectivamente, 6,55 g (65,5%) de éster impuro e 2,32 g (30%) de ácido impuro. Cristalizou-se o ácido impuro no seio de etanol diluído em água para se obter 1,69 g (21,8%) de cetoprofeno sob a forma de um pó branco. Verificou-se, por CLAP das amidas, tal como se descreveu no exemplo 18, que o ácido possuía um excesso enantiomérico de 91,3% para o ácido com a configuração S.

Exemplo 22

Neste exemplo, demonstra-se o efeito de DMF e agentes tensioactivos na hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno em cetoprofeno utilizando CSC-2. Os tensioactivos utilizados foram o Tween 80 e Span 85.

Adicionaram-se pequenas quantidades de DMF à mistura reaccional para aumentar a solubilidade de monoglicerido de cetoprofeno (MCP). Utilizou-se em todos os casos tampão de fosfato de amónio 100 mM (pH 5,5) e, adicionaram-se 2% (v/v) de detergentes e, o volume total era de 10 ml. O MCP foi adicionado directamente ou dissolvido em 200 μ l de DMF. Em todos os casos a proporção enzima substrato de 1:50. Fornecem-se, a seguir, os resultados que se obtiveram, após análise efectuada tal como se descreveu no exemplo 18.

QUADRO 12Efeito de DMF na hidrólise de KPG na presença de detergentes

KPG (mg)	DMF (μ l)	<u>Tween-80 em tampão</u>			<u>Span-85 em tampão</u>		
		Proporção	Proporção	Rel. %ee	Proporção	Proporção	Rel. %ee
50	200	1,63	100 ¹	96	1,37	100 ²	93
100	200	0,64	40	92	2,39	175	96
200	200	0,28	17	86	1,47	107	95
50	0	2,10	129	97	3,69	269	97
100	0	1,62	99	96	2,97	216	97
200	0	1,04	64	93	1,70	124	95

¹ = estabeleceu-se 100 como norma para todas as reacções em Tween-80

² = estabeleceu-se 100 como norma para todas as reacções em Span-85

Os resultados obtidos indicam o efeito prejudicial de DMF na proporção e no ee. A utilização de tensioactivos proporcionou uma boa proporção e um bom ee.

Exemplo 23

Hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno num sistema bi-fásico aquoso-orgânico.

Adicionou-se monoglicerido de cetoprofeno (10,9 mg) em DMF (50 μ l) a diversos dissolventes orgânicos (2 ml de cada) e adicionou-se a cada um, uma solução de CSC-2 (0,4 mg) em tampão de fosfato de amónio 100 mM (pH 5,5, 2 ml). A reacção com tampão (entrada # 2 no quadro) continha enzima em tampão (2 ml) e a reacção apenas com tampão (entrada # 1, no quadro) não continha enzima.

Após ter-se agitado a 150 rpm, analisaram-se as mis-

turas reaccionais, de acordo com métodos normalizados, tal como descrito no exemplo 18. No quadro 13, indicam-se os resultados.

QUADRO 13

Hidrólise do Monoglicérido de Cetoprofeno por CSC-2 em sistemas de duas fases - orgânica - aquosa

Nº	<u>Solvente</u>	<u>Proporção relativa</u>	<u>EE do S-ácido(%)</u>
1	Apenas com tampão (sem enzima)*		
2	Tampão	100	96
3	Hexano	80	93
4	Iso-octano	214	96
5	Ciclo-hexano	185	95
6	Ciclo-hexeno	146	89
7	Ciclo-octeno	387	95
8	Tolueno	15	58
9	Xilenos	44	81
10	Etil-benzenos	18	48
11	Cumene	91	86
12	1,2,3,4-Tetra-hidro-naftaleno	136	85
13	Tetracloroeto de carbono	48	95
14	Clorofórmio S	0	
15	Dicloro-metano	0	
16	1,1,1-Tricloro-etano	25	75
17	Dicloreto de etileno S	0	
18	1,1,2-tricloro-etano S	0	
19	Tetracloro-etileno	3	27
20	1,1,2-Tricloro-trifluoro-etano	123	99
21	Éter etílico S	0	
22	Éter isopropílico	53	69
23	Éter n-butílico	59	69
24	Ciclo-hexanona S	0	
25	3-Pentanona S	0	
26	n-butanol S	0	
27	n-hexanol S	0	
28	n-Octanol S	0	
29	Alcoól benzílico	0	
30	Acetato de etilo	0	

* Todos os valores do quadro foram corrigidos por este controlo S reacções que duraram 16 horas, todas as outras tiveram a duração de 26 horas.

Os resultados anteriores mostram que se podem utilizar determinados dissolventes de baixa polaridade para melhorar a proporção de hidrólise com efeitos mínimos sobre o excesso enantiomérico.

Exemplo 24

Imobilização de CSC-2 e a sua utilização na hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno.

Adicionou-se a 10 ml de fosfato de amónio 100 mM (pH 5,5), uma solução de 50 mg de monoglicérido de cetoprofeno em 200 μ l de DMF, seguindo-se-lhe CSC-2 (imobilizado, de acordo com diferentes métodos e, contendo o equivalente a 2 mg de CSC-2). Após ter-se agitado a 250 rpm, a 35°C, acidificaram-se as misturas reaccionais, extraíram-se com clorofórmio e, analisaram-se por CLAP, de acordo com o exemplo 8. No Quadro 14, indicam-se os resultados.

Os métodos de imobilização foram os seguintes:

1) 269-I

Misturaram-se 2 mg de lipase CSC-2 com 0,3 g de Amberlite DP-1 e 200 mg de XAMA-7 em 10 ml de ciclo-octeno. Agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante 4 horas, antes de se evaporar o ciclo-octeno. Lavou-se o enzima imobilizado com água DI e, armazenou-se a 4°C.

2) 269-II

Idêntico a 269-I, com excepção de se terem adicionado 50 mg de ácido esteárico.

3) Idêntico a 269-I, com excepção de se terem adicionado 50 mg de hexadecilamina.

4) 269-A a 2G

Idêntico a 269-II. Ajustou-se o pH da Amberlite DP-I, con-

forme se segue:

2A pH 3,5

2B pH 4,5

2C pH 5,5

2D pH 6,5

2E pH 7,5

2F pH 8,5

2G pH 9,5

5) 269-5A

Agitaram-se 2 mg de lipase CSC-2, dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato (0,01 M, pH 6,5), com gotas de celulose (0,5 g) activadas com periodato de sódio (5%), à temperatura ambiente. Lavou-se o enzima imobilizado com água desionizada e armazenou-se a 4°C.

6) 269-5B

Agitaram-se 2 mg de lipase CSC-2, dissolvidos em 1 ml de tampão fosfato (0,01 M, pH 6,9), com 0,58 g de Affi-Prep 10, à temperatura ambiente, durante 24 horas. Lavou-se o enzima imobilizado e, armazenou-se a 4°C.

7) 269-7F

Equilibrrou-se resina Amberlite DP-1, a pH 3,5, lavou-se com acetona e, desidratou-se a 100°C. Misturam-se 2 mg de lipase CSC-2, em 1 ml de tampão fosfato (0,01 M, pH 5,0) com 0,3 g de resina desidratada e liofilizou-se a mistura. Agitou-se o enzima liofilizado em 5 ml de ciclo-octeno contendo ácido esteárico (50 mg) e XAMA-7 (50 mg), à temperatura ambiente e, deixou-se o ciclo-octeno evaporar, durante a noite. Lavou-se o enzima imobilizado e armazenou-se a 4°C. Utilizaram-se gotas de celulose para se preparar 269-7G, de acordo com o mesmo procedimento, Dowex 50 w X 4 para 269-7E e Amberlite A15 para 269-7D.

8) 269-8A

Idêntico a 269-7F mas com XAMA-7.

269-8B

Idêntico a 269-7F

9) 269-9A

Agitaram-se 2 mg de lipase CSC-2, com 0,5 g de gotas de celulose activadas por Na_2O_4 em tampão, a pH 5,0, durante 20 horas recolheu-se o enzima, lavou-se e, armazenou-se a 4°C.

10) 269-9B

Idêntico a 269-9A, mas a pH 7,0.

11) 269-10

Misturaram-se 25,1 mg de lipase CSC-2, com 0,2 g de celulose CM em 5 ml de ciclo-octeno, contendo 1,0 ml de ácido esteárico a 10%. Agitou-se a mistura durante 1 hora antes de se adicionarem 2,0 ml de XAMA-7 a 10%, no mesmo dissolvente. Agitou-se a mistura, à temperatura ambiente durante a noite e, evaporou-se durante a noite o ciclo-octeno. Recolheu-se o enzima imobilizado, lavou-se e armazenou-se a 4°C.

12) 269-11A e 269-11D

Misturaram-se 10 mg de lipase CSC-2 e 150 mg de glicose em 5 ml de água desionizada, com 1,25 g de Amberlite DP-1 (pH 3,5) e, liofilizou-se a mistura. Agitou-se o enzima liofilizado em 20 ml de ciclo-octeno (269-11A) ou de 1,1,2-tricloro-trifluoroetano (269-11D) com 250 mg de XAMA-7 e 500 mg de ácido esteárico. Utilizou-se este procedimento para se prepararem 269-11B, 269-11C, 269-11E e, 269-11F.

13) 269-12A

Idêntico a 269-9B mas, com EDTA a 0,1%.

269-12B

Idêntico a 269-12A, mas a pH 8,5.

14) 269-13

Idêntico a 269-8A, mas, com adição de 110 mg de amido.

15) 269-14A

Misturaram-se 10 mg de lipase CSC-2 em 5 ml de água desionizada, com 1 g de gotas de celulose desidratada e liofilizou-se a mistura. Imobilizou-se o enzima liofilizado em 20 ml de ciclo-octeno com 400 mg de ácido esteárico e 200 mg de XAMA-2. Utilizaram-se gotas de celulose CM para se preparar 269-14B.

16) 279-SD1

Adicionou-se a 1 g de sílica (Sephárosil, 400 LS, IBF), uma solução de 10 mg de lipase CSC-2 em 4 ml de tampão de fosfato de amónio 100 mM (pH 5,5) e agitou-se lentamente a mistura, durante 22 horas. Filtraram-se os sólidos e, lavaram-se com o mesmo tampão (5 X 10 ml). Descobriu-se que a solução não possuía actividade, toda a actividade se tinha conservado na parte sólida.

QUADRO 14Estudos com CSC-2 Imobilizado

<u>Código</u>	Actividade	
	(%) de	%
		ee
		do
	<u>CSC-2</u>	<u>S-ácido</u>
Imobilização com DP-1	livre	
269-I	1	ND
269-II	23	70
269-II	5	ND
269-2A a -2G	1-5	ND
269-7F	51	80
269-8A	9	ND
269-8B	38	70
269-11A	41	81
269-11D	22	81
269-13	4	ND
Imobilização com celulose		
269-7G	59	87
269-11B	31	76
269-11E	7	ND
269-14A	48	87
Imobilização com CM-celulose		
269-10	7	ND
269-11C	50	82
269-11F	40	82
269-14B	61	85
Imobilização com celulose activada por periodato		
269-5A	27	96
269-9A	10	92
269-9B	17	93
269-12A	7	ND
269-12B	7	ND

...

Imobilização com outros suportes

269-5B	11	76
269-7D	1	ND
269-7E	6	ND
279-SD1	107	97

ND = Não determinado

Exemplo 25

Imobilização do enzõzima de lipase CSC-2 purificado em Eupergit C e a sua utilização na hidrólise.

Lavou-se 1 mg de resina Eupergit C (Hoechst), com 20 volumes de Na_2HPO_4 0,1 M, a pH 6,0. Adicionaram-se à resina seis mililitros do mesmo tampão contendo 3,0 mg de lipase purificada e deixou-se reagir a 4°C mexendo lentamente, durante 16 horas. Lavou-se, então este agente catalítico com 10 volumes de tampão pH 6,0 . Adicionou-se o agente catalítico a 100 ml de HPPA-Me 25 mM em Na_2HPO_4 50 mM, a pH 6,5 a 25°C e agitou-se lentamente. A recuperação da actividade relativa do enzima imobilizado foi de 39%, com base nos ensaios de CLAP da conversão de éster em ácido de configuração R e ácido de configuração S. A hidrólise a 42% do éster R-S em ácido foi de 97% de R.

Exemplo 26

Neste exemplo, descreve-se o efeito dos ácidos orgânicos na imobilização da lipase MY.

Misturou-se lipase MY (0,45 g), Amberlite DP-1 desidratada (0,9 g) e XAMA-7 (propionato de pentaeritritol-tris-(beta-N-aziridinilo) (100 mg), em 10 ml de tolueno contendo um dos seguintes ácidos saturados: ácido propiónico (30 mg), ácido butírico (30 mg), ácido valérico (30 mg), ácido hexanoico

(30 mg), ácido heptanoico (30 mg), ácido octanoico (40 mg), ácido nonanoico (40 mg), ácido decanoico (40 mg), ácido undecanoico (40 mg) ácido láurico (40 mg), ácido tridecanoico (40 mg), ácido mirístico (40 mg), ácido pentadecanoico (50 mg), ácido palmítico (50 mg), ácido heptadecanoico (50 mg) ácido esteárico (50 mg) ácido docosanoico (30 mg), ácido eicosanoico (50 mg) e ácido tetracosanoico (50 mg). Agitaram-se as misturas, à temperatura ambiente e depois evaporou-se, cuidadosamente, o tolueno. Hidrataram-se as preparações de enzima imobilizado, lavaram-se com água desionizada e ensaiaram-se. Como se indica na fig. 8, um ácido de 18 carbonos, o ácido esteárico, proporciona percentagens de imobilização superiores.

Exemplo 27

Efeito do ácido esteárico na actividade da lipase.

Misturaram-se 0,45 g de lipase MY, 0,9 g Amberlite DP-1 desidratada e 100 mg de XAMA-7, em 10 ml de tolueno contendo 4,5, 11,25; 22,5; 45 e 90 mg de ácido esteárico, de acordo com o procedimento do exemplo 24. Na fig. 9, indicam-se os resultados.

Exemplo 28

Optimização da adição de ácido esteárico para imobilização.

Agitaram-se 3,6 g de lipase MY, em 200 ml de tampão de acetato de sódio (1 M, pH 3,5) com 27 g de Amberlite DP-1 e ajustou-se o pH para 4,5 com ácido acético. Agitou-se a mistura a 4°C durante a noite e recolheram-se as gotas, lavaram-se com água desionizada e liofilizaram-se para se obter 8,1 g de gotas secas. Adicionaram-se então as gotas, (1 g), a 10 ml de tolueno contendo 100 mg de XAMA-7 e 10; 25 ou 50 mg de ácido esteárico e misturou-se lentamente. Indicam-se na figura 10 os re

sultados do ensaio, que se obtiveram tal como descrito no exemplo 24.

Exemplo 29

Imobilização de CSC-1 com poliaziridina.

Combinaram-se 500 mg de isóxima CSC-1 com 0,5 gramas de álcool de polivinilo hidrolisado a 75% (3000 MW) e 230 ml de água desionizada arrefecida com gelo e misturam-se, durante 15 minutos. Adicionou-se à mistura 100 gramas de resina de permuta de iões, Amberlite DP-1 anidra (Rhom-Haas), a pH 7,0. Deixou-se a mistura em repouso, durante 20 minutos, à temperatura ambiente antes de se liofilizar o material. Após ter-se completado a liofilização, adicionaram-se às gotas uma mistura de 140 ml de tolueno e 3,5 gramas de ácido esteárico e deixou-se em repouso durante 1 hora. Adicionou-se à mistura, 40 ml de tolueno e 7 gramas do pré-polímero de poliaziridina de XAMA-7, e adicionou-se novamente igual quantidade, uma hora mais tarde. Cobriu-se a mistura e agitou-se lentamente durante um período de 4 horas, tendo-se neste ponto, evaporado o tolueno lentamente. Lavou-se a preparação de enzima imobilizado com duas aliquotas de 250 ml de água desionizada.

Determinou-se a actividade do CSC-1 purificado numa forma solúvel, era de 550 μ Moles/hora/mg a uma conversão de 35% de HPPA-Me em HPPA. Descobriu-se que o CSC-1 imobilizado desta experiência possuía uma actividade de 920 μ Moles/hora/g de gotas imobilizadas a uma conversão de 37% ou 231 mMoles/hora para o lote total. Verificou-se que o material de lavagem das gotas possuía uma actividade de 32 mMoles/hora em todos os materiais de lavagem. Com base nestes dados, descobriu-se que 84% da actividade do enzima estava imobilizada, 12% encontrava-

-se no material de lavagem e não se quantificou 4% da actividade.

Exemplo 30

Neste exemplo ilustra-se o efeito do álcool polivinílico (PVA) na imobilização de CSC-1 de lipase e na sua actividade.

Liofilizaram-se 5 mg de CSC-1 de lipase em 5 ml de água desionizada, com Amberlite DP-1 (0,3 g) e, 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mg de álcool de polivinilo (MW 3 000, hidrolisado a 75% ou MW 10 000, hidrolisado a 88%). Imobilizou-se então o enzima com 50 mg de ácido esteárico e 50 mg de XAMA-7 em 6 ml de tolueno. Após ter-se evaporado o tolueno, ensaiou-se o enzima imobilizado com HPPA-Me e, calculou-se a actividade relativa do enzima.

<u>PVA (MW 3.000)</u>	<u>Actividade Relativa</u>
(mg)	(%)
0	100
10	149
20	145
30	143
40	136
50	153

<u>PVA (MW 3.000)</u>	<u>Actividade relativa</u>
(mg)	(%)
0	100
10	119
20	123
30	126
40	121
50	97

Os resultados anteriores mostram que a adição de PVA serve para aumentar a actividade relativa de CSC-1 de lipase.

Exemplo 31

Imobilização da lipase MY impura.

Combinou-se 1 grama de lipase MY com 25 ml de Na_2HPO_4 25 mM, a pH 6,5 e misturou-se bem, durante 20 minutos e depois centrifugou-se. Arrefeceu-se o sobrenadante para 10°C e adicionou-se a 13 mililitros de Amberlite DP-1 anidra (pH 7,0). Liofilizou-se, então, este material. Adicionou-se uma mistura de 16 ml de tolueno e 0,42 g de ácido esteárico do material liofilizado e agitou-se durante uma hora. Depois, adicionou-se uma mistura de 10 ml de tolueno e 2,5 g de pré-polímero de XA-MA-7, durante um período de uma hora. Cobriu-se a mistura e deixou-se em agitação durante 4 horas após o que o tolueno evaporou lentamente. Lavaram-se as gotas duas vezes com aliquotas de 100 ml de água desionizada. Uma comparação da actividade hidrolítica sobre HPPA-Me de lipase MY e lipase MY imobilizada demonstrou que a actividade da lipase MY foi de 4700 $\mu\text{Moles/hora/grama}$ a uma conversão de 17% de HPPA-Me em HPPA. A lipase MY imobilizada possuía uma actividade de 2160 $\mu\text{Moles/hora/lote}$ a uma conversão de 16%. Os materiais de lavagem possuíam uma actividade estimada em 175 $\mu\text{Moles/hora/lote}$. Deste modo, conservou-se 50% da actividade do enzima, da actividade original 46% encontrava-se imobilizada e, 4% encontrava-se no material de lavagem.

Exemplo 32

Isolamento do ácido R-2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico.

Dissolveu-se éster metílico de RS-HPPA (2 moles; 392 gm) em 1500 ml de tolueno. Adicionaram-se ao tolueno três litros de acetato de amónio 0,58 M, a pH 6,5. e 3 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Adicionou-se lipase MY imobilizada (160 ml, preparada de acordo

com o exemplo 9), à mistura de duas fases do substrato anterior e, deixou-se reagir com agitação a 25°C, durante 120 horas. Neste ponto, 40,8% do éster encontrava-se hidrolisado. Separou-se a fase aquosa da camada orgânica e ajustou-se o pH para 7,0. Extraíu-se esta fase 4 vezes com 0,25 volumes de cloro de metileno, para eliminar o éster. Ajustou-se a fase aquosa para pH 2,5 e extraiu-se 4 vezes com 0,25 volumes de acetato de etilo. Adicionou-se $MgSO_4$ (anidro) ao acetato de etilo para eliminar a água e, filtrou-se a camada orgânica. Eliminou-se o acetato de etilo em condições de pressão reduzida, a 50°C deixando o ácido R-2-(4-hidroxifenoxi) propiônico sólido. O ácido continha 95% de ácido com a configuração R e 5% de ácido com a configuração S.

Exemplo 33

Neste exemplo demonstra-se o melhoramento do tempo de vida do agente catalítico imobilizado, CSC-1.

Colocou-se CSC-1 imobilizado (19 ml), preparado tal como no exemplo 29, numa coluna de cromatografia de 1 cm X 24 cm. Lavou-se, então este material com 50 volumes da coluna de água desionizada para eliminar a proteína não ligada. Preparou-se substrato HPPA-Me 25 mM, por combinação de 34,8 g de K_2HPO_4 , 4 litros de água desionizada e 4 g de ditionito de sódio, ajustando-se o pH para 6,5, utilizando ácido fosfórico e adicionando depois 19,6 gramas de R,S-HPPA-Me. Fez-se passar esta solução através de um enzima a 0,75 ml/minuto (2,4 volumes de coluna/hora). Analisaram-se as amostras diariamente para se determinar a actividade enzimática do agente catalítico.

Conforme se indica na figura 11, tratou-se a coluna durante período de 40 dias sem perda aparente da actividade catalítica.

Exemplo 34

Preparação de lipase de Candida rugosa por cromatografia QA-Trisacryl M.

Como um método alternativo para se isolar CSC-1 da lipase, dissolveram-se 2,1 mg de lipase MY (meito Sangyo) em 32 ml de água desionizada e dialisou-se contra Na_2HPO_4 25 mM, a pH 6,3. Eliminaram-se os sólidos por centrifugação. Aplicou-se a proteína numa coluna QA-Trisacryl M (IBF), de 2,5 X 4,0 cm, equilibrada com histidina 25 mM - HCl a pH 6,0, a 62 ml/hora. Lavou-se a coluna com o mesmo tampão até que a absorvância a 280 nm atingisse a linha base. Recuperou-se um grande pico de material não ligado a A_{280} contendo CSC-1 de lipase e 4-5 componentes proteicos menores, com base numa análise FIE com pH compreendido entre 3-9 utilizando um sistema de gel Pharmácia Phast.

Eluiu-se a proteína que se ligou à coluna de QA-Trisacryl M, utilizando um gradiente de 200 ml de NaCl entre 0 e 0,3 M, em histidina -HCl 25 mM, a pH 6,0.

Ensaçou-se a fracção representativa de CSC-I para a hidrólise estereosselectiva do éster metílico de R,S-HPPA, tal como descrito no exemplo 3. A 41% de conversão o produto consistia em 98% ácido de configuração R.

Exemplo 35

Hidrólise do éster metílico de ibuprofeno.

Submeteu-se o éster metílico de ibuprofeno (200 mg) a hidrólise enzimática, tal como descrito no exemplo 18 e determinou-se a quantidade de ácido produzida por CLAP numa coluna ODS-3 RAC, utilizando $\text{CH}_3\text{OH} : (\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (80:20), 2 ml/minuto e monitorizando a 220 nm. Determinou-se o ee de ácido produzido por conversão em amida diastomérica, tal como no exem

plo 18 e analisou-se por CLAP numa coluna Hibar Lichrosorb Si60 (5 μ m, 4 mm X 25 cm, E. Merck), utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{CN}$ (96:4) como eluente a 2 ml/minuto e monitorizando a 254 nm. No quadro a seguir, indicam-se os resultados.

QUADRO 15

Resultados da Hidrólise do Éster Metílico de Ibuprofeno

<u>Balão</u>	<u>DMF</u>	<u>Enzima</u>	<u>Percentagem de ácido</u>	<u>Proporção Mole/hr/mg</u>	<u>% ee do ácido de configuração S</u>
1*	200 μ l	Sem enzima	0		
4	200 μ l	Lipase MY (50 mg)	29	0,2	96
5	0 μ l	Lipase MY (50 mg)	28	0,2	96
6	200 μ l	CSC-2 (1 mg)	32	13,3	97
7	0 μ l	CSC-2 (1 mg)	28	11,4	98
8	200 μ l	CSC-1 (1 mg)	4	1,8	96
9	0 μ l	CSC-1 (1 mg)	5	2,1	95

* Para este ensaio de controlo utilizaram-se 100 mg de éster metílico de ibuprofeno

Exemplo 36

Hidrólise do éster metílico de fenoprofeno:

Utilizou-se o éster do mesmo modo que sem qualquer DMF.

Submeteu-se éster metílico de fenoprofeno (56 mg ou 112 mg) a hidrólise enzimática, de acordo com o descrito no exemplo 18 e determinou-se a quantidade de ácido produzida por CLAP numa coluna ODS-3RAC, utilizando $\text{CH}_3\text{OH}:(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (60:40), como eluente a 4 ml/minuto e monitorizou-se a 254 nm. Determinou-se o ee do ácido produzido por conversão em amidas diastoméricas tal como no exemplo 18, e analisando depois por CLAP numa

coluna Hibbar Lichrosorb Si60 (5 μ m), utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{CN}$ (96:4) a 2 ml/minuto e monitorizando a 254 nm. Indicam-se os resultados no quadro que se segue.

Hidrólise do Éster Metílico de Fenoprofeno

<u>Ester</u>	<u>Enzima</u>	<u>Proporção ee do ácido de con-</u>		
		<u>Acido (%)</u>	<u>μMole/hr/mg</u>	<u>figuração S (%)</u>
56 mg	Sem enzima	0		
56 mg	Lipase MY (50 mg)	16	0,03	80
112 mg	Lipase MY (50 mg)	17	0,07	89
56 mg	CSC-2 (1 mg)	22	2,2	96
112 mg	CSC-2 (1 mg)	13	2,6	96
56 mg	CSC-1 (1 mg)	20	2,0	95
112 mg	CSC-1 (1 mg)	14	2,8	96

Exemplo 37

Neste exemplo descreve-se a hidrólise do éster metílico do ácido 2-fenil-propiónico.

Submeteu-se o éster a hidrólise enzimática sem adição de DMF, efectuada de acordo com o descrito no exemplo 18. Determinou-se a quantidade de ácido produzida por CLAP numa coluna ODS-3 RAC, utilizando $\text{CH}_3\text{OH}:(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (60:40) a 4 ml/minuto e, monitorizando a 220 nm. O ácido produzido na reacção foi convertido nas amidas diastoméricas, tal como no exemplo 18, e analisado numa coluna Hibbar Lichrosorb Si60 (5 μ m) utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{CN}$ (98:2) a 2 ml/minuto e monitorizando-se a 254 nm para se determinar o excesso enantiomérico. Indicam-se os resultados no quadro 16, a seguir:

QUADRO 16Hidrólise do éster metílico do ácido 2-fenilpropiónico

<u>Ester</u> (mg)	<u>Enzima</u>	<u>Percentagem de Ácido</u>	<u>Proporção</u> <u>μMole/hr/mg</u>	<u>ee do ácido de</u> <u>configuração S (%)</u>
43,7	Lipase MY (50 mg)	28	0,07	88
		31	0,08	88
46,7	CSC-2 (1 mg)	18	2,4	93
		17	2,1	93
47,4	CSC-1 (1 mg)	9	1,2	91
		9	1,2	89

Exemplo 38

Neste exemplo descreve-se a hidrólise do monoglicérido de indoprofeno.

Submeteu-se a hidrólise o monoglicérido de indoprofeno (50 mg), tal como descrito no exemplo 18, com quantidades superiores de enzimas, tal como se indica no quadro 17. Decorridas 68 horas, extraíu-se a mistura reaccional de acordo com o procedimento indicado no exemplo 18 e determinou-se a quantidade de ácido produzido, por CLAP numa coluna ODS-3 RAC, utilizando $\text{CH}_3\text{OH}-(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (60:40) a 4 ml/minuto e detecção a 254 nm. Determinou-se o excesso enantiomérico por CLAP da amida diastomérica (preparada de acordo com o exemplo 18) no mesmo sistema. O isómero R e o isómero S da amida do autêntico R,S-indoprofeno proporcionou picos numa área ligeiramente diferente e, calculou-se o excesso enantiomérico tendo em conta esta diferença. Para além disto, separou-se uma pequena quantidade de mistura

reaccional em ácido e éster por extracção com NaHCO_3 e determinaram-se e referem-se adiante as suas rotações. Por analogia com outros profenos, designou-se o ácido com rotação positiva e cuja amida diastomérica com D-(+)-1-fenil-etil-amina que se eluiu posteriormente no sistema CLAP por configuração S. No quadro 17 indicam-se os resultados.

QUADRO 17

Hidrólise do monoglicérido de Indoprofeno

<u>Enzima</u>	<u>Acido (%)</u>	<u>Proporção</u>	Rotação			
			<u>Acido (S-R)</u>	<u>Acido</u>	<u>Observada</u>	
			(%)	(%)	<u>Acido</u>	<u>Ester</u>
RS-Indoprofeno			15,8			
Lipase MY (100 mg)	8.2	0,0017	-35,4	51,2(R)	+ .012	+ .005
CSC-2 (10 mg)	2.3	0,0048	40,8	25,0(S)	- .007	- .005
CSC-1 (10 mg)	1.8	0,0037	-43,8	59,6(R)	+ .013	+ .002

Exemplo 39

O efeito de Tween 80 na hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno por CSC-2, demonstra-se a seguir.

A presença de um tensioactivo, tal como o Tween 80, aumenta a solubilidade dos compostos lipofílicos na água. Efectuaram-se ensaios para se descobrir se o tensioactivo podia aumentar a solubilidade do monoglicérido de cetoprofeno e determinar os seus efeitos na hidrólise com CSC-2. Em balões de 50 ml, dissolveu-se 1 mg de CSC-2 em 10 ml de tampão $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 100 mM (pH 5,5). Adicionou-se Tween 80 para se obter uma solu-

ção a 1% e a 2% (v/v). Adicionou-se a cada um dos dois balões albumina de soro de bovino (BSA) (10 mg). Adicionou-se a cada um deles uma solução de 50 mg de monoglicérido de cetoprofeno em 200 μ l de DMF. Decorridas 20 horas, acidificaram-se as misturas de reacção a 250 rpm e 35°C, extraíram-se e analisaram-se de acordo com o procedimento usual CLAP, descrito no exemplo 18. No quadro 18 indicam-se os resultados.

QUADRO 18

Efeito de "Tween 80" e de BSA na Hidrólise

<u>Reacção</u>	<u>Proporção relativa</u>	<u>ee do ácido de configuração S (%)</u>
Sem Tween nem BSA	100	98
1% Tween e BSA	114	95
2% Tween e BSA	142	96
2% Tween sem BSA	118	96

Exemplo 40

Utilizaram-se diversos tensioactivos a 2% do volume reaccional para se determinar o seu efeito na reacção enzimática envolvendo a conversão do monoglicérido de cetoprofeno (KPG) em cetoprofeno (KP). Adicionaram-se a balões de Erlenmeyer 200 μ l de tensioactivo, 50 mg de KPG dissolvido em 200 μ l de DMF 1 mg de enzima CSC-2 em 1 ml de tampão e 9 ml de tampão (NH_4) H_2PO_4 , 100 mM, pH 5,5). Cobriram-se os balões com uma membrana e incubaram-se em banho maria a 35°C a 250 rpm, geralmente durante a noite. Pôs-se termo às reacções por acidificação, extraíram-se com CHCl_3 (2 X 10 ml). Determinou-se a percentagem de ácido e a percentagem de ee, de acordo com o método do exemplo 18. No quadro 19, indicam-se os resultados do ensaio, utilizando tensioactivos. Deve notar-se que os valores do Balanço

Hidrofilico-Lipofilico (BHL) não tiveram, aparentemente influência na capacidade do tensioactivo para aumentar a capacidade de conversão de KPG em KP.

QUADRO 19

Efeitos dos Surfactantes na Hidrólise do Monoglicérido de Ceto-
profeno

<u>Aditivo</u>		<u>HLB</u>	<u>Proporção Relativa</u>
0 (enzima apenas, Lipase CSC-2) -			100
Arlacel	83	3,7	172
Brij	35	16,9	26
"	72	4,9	106
"	76	12,4	18
"	78	15,3	14
"	92	4,9	27
"	96	-	27
"	99	15,3	15
Igepal	CO-210	4,6	42
"	CO-430	8,9	27
"	CO-520	10,5	25
"	CO-530	10,9	23
"	CO-720	13,3	32
"	CO-890	17,1	30
PEG	P1	-	98
"	P4	-	96
"	P11	-	69
Pluronic	P2010	-	79
"	V10	-	39
"	P75	-	29
"	L64	-	33
"	L92	-	12
"	F147	-	82
Span	20	8,6	75
"	40	6,7	99
"	60	4,7	108
"	80	4,3	160
"	85	1,8	181
Tween	20	16,9	39
"	40	15,6	29
"	60	14,9	23
"	61	14,9	92
"	65	10,5	39
"	80	15,0	136
"	85	11,0	27

Dos tensioactivos anteriormente referidos, efectuou-se a série Tween de sorbitanos de polioxietileno (POE) com 20 unidades de POE, com excepção do Tween 61 em que se utilizaram 5 unidades de POE. Efectuou-se a série Span, dos sorbitanos (sem POE) com idêntica sequência de numeração. Todos os tensioactivos descritos são de Sigma, salvo especificação em contrário. O Tween e o Span 20 são um monolaurato, o 40 é um monopalmitato, o 60 é um monoestearato, o 61 (Serva) é também um monoestearato, o 65 é um triestearato, o 80 é um mono-oleato e o 85 é um tri-oleato. O Arlacel 83 é sesquiolato de sorbitano. A série Brij efectuou-se a partir de ésteres polioxietileno (POE). O Brij 35 é éter laurílico de POE-23. Brij 72 é éter estearílico de POE-2, o Brij 76 é éter estearílico de POE-10, o Brij 78 éter estearílico de POE-20, Brij 92 é éter oleílico de POE-2, Brij 96 é éter oleílico de POE-10 e Brij 99 é éter oleílico de POE-20. A série Igepal (GAF), efectuou-se a partir de éteres nonilfenólicos de POE, consistindo todos eles em $C_{15}H_{24}O$, com quantidades variáveis (n) de C_2H_4O ligadas. Igepal CO-210 é $C_{15}H_{24}O-(C_2H_4O)_n=1,5$, CO-430 $n=4$, CO-520 $n=5$, CO-530 $n=6$, CO-720 $n=2$, e CO-890 $n=40$. Os ésteres dimetilicos de polietilenoglicol (PEG) (Hoechst) utilizados, possuíam um comprimento de 2000 (P4), 1000 (P1) e 250 (P11). Os pluracois e plurónicos referidos na lista são poliois.

Exemplo 41

O efeito dos tensioactivos de éster de oleato na actividade de CSC-2 com monoglicérido de cetoprofeno demonstrou-se como se segue:

Pesaram-se individualmente, 75 mg de KPG (na ausência de DMF) e colocaram-se em balões de Erlenmeyer. Adi-

cionou-se 1 mg de CSC-2 em 1 ml de tampão, bem como 100, 200, ou 500 μ l de tensioactivos de éster de oleato, perfazendo com eles o volume da mistura reaccional de 1%, 2% e 5%. Adicionaram-se 9 ml de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 100 mM, a pH 5,5 e colocaram-se os balões numa incubadora, a 35°C, a 750 rpm, em banho maria, durante 20 horas. Acidificaram-se as misturas reaccionais, extraíram-se com CHCl_3 e examinaram-se por CLAP, tal como no exemplo 18. Determinou-se a percentagem de ee, tal como no exemplo 18. No quadro 20, indicam-se os resultados.

Quadro 20

<u>Aditivo</u>	<u>% de Ácido</u>	<u>Ácido de configuração S</u>
0	19	96
100 μ l Tween 80	12	
200 μ l "	22	96
500 μ l "	18	
100 μ l Span 85	28	
200 μ l "	33	96
500 μ l "	34	
100 μ l Arlancel 83	30	
200 μ l "	30	99
500 μ l "	29	
100 μ l Span 80	27	
200 μ l "	28	97
500 μ l "	27	

Exemplo 42

Para se determinar o efeito do ácido oleico e de outros ésteres do ácido oleico, efectuou-se um ensaio utilizando um protocolo idêntico ao do exemplo 41. Dissolveram-se 50 mg de

KPG em 200 μ l de DMF, adicionou-se 1 mg de CSC-2 em 1 ml de tampão e utilizaram-se 9 ml de tampão. Adicionaram-se diversas quantidades de ácido oleico ou dos seus ésteres, pôs-se termo às reacções nos períodos indicados, acidificaram-se, extraíram-se com CHCl_3 e analisaram-se tal como no exemplo 18. Apresentam-se os resultados no quadro 21.

QUADRO 21

Tempo	Aditivo	% de ácido	Proporção	% ee de ácido de
				configuração S
18 hr	Nenhum	23	2	ND
"	100 μ l trioleina	38	3	ND
"	100 μ l Dioleina	42	4	ND
"	100 μ l Monoleina	43	4	ND
23 hr	Nenhum	29	2	96
"	200 μ l de ácido oleico	47	3	96
"	200 μ l éster metílico			
	ácido oleico	51	3	97
"	200 μ l éster etílico			
	ácido oleico	52	4	96

ND = Não Determinado

Exemplo 43

A utilização de azeite como um intensificador da actividade de CSC-2, demonstra-se do seguinte modo:

Efectuou-se um ensaio, tal como no exemplo 41, mas utilizou-se 100, 200 e 500 μ l de azeite para se determinar se este poderia intensificar a percentagem de conversão de KPG em KP. O método foi idêntico ao utilizado no exemplo 41 (50 mg de KPG 1 mg de CSC-2 em 1 ml de tampão, 9 ml de tampão, azeite, 35°C, 250 rpm, 20

horas). Decorridas 20 horas, acidificaram-se todas as misturas reaccionais, extraíram-se com CHCl_3 e analisaram-se por CLAP tal como no exemplo 18. Indicam-se a seguir os resultados:

<u>Aditivo</u>	<u>% ácido</u>
Nenhum	19
100 μl azeite	34
200 μl azeite	40
500 μl azeite	42

Exemplo 44

Utilizou-se o azeite e outros óleos como substratos para a hidrólise com CSC-2, tal como se segue:

Efectuou-se uma suspensão de azeite (1 g), em 10 ml de tampão de fosfato de amónio 100 mM (pH 5,5). Adicionou-se uma solução de 1 mg de CSC-2 em 1 ml do mesmo tampão e agitou-se a mistura a 250 rpm a 35°C , durante 1 hora. Pôs-se termo á reacção mediante a adição de 10 ml de uma mistura de acetona e metanol (1:1), diluída com 50 ml de água e titulada com uma solução normalizada de hidróxido de sódio, utilizando fenolftaleína como indicador. Comparou-se então, o resultado com a reacção de controlo sem o enzima. A reacção com enzima produziu 1,31 moles de ácido, numa hora.

Ensaaiaram-se outros triglicéridos naturais como substratos de lipase MY, CSC-1 e de CSC-2. Colocaram-se 200 μl de cada um dos óleos numa ampola de cintilação com enzima (1 mg de CSC-1 ou CSC-2 ou 50 mg de lipase MY) em 2 ml de tampão (NH_4) H_2PO_4 100 mM, a pH 5,5). Alguns balões receberam também 20-30 mg de monoglicérido de cetoprofeno (KPG). Também se utilizou o ácido oleico como um substrato para trans-esterificação. Após uma incubação durante a noite a 35°C , a 250 rpm, analisaram-se

as misturas reaccionais por cromatografia em camada fina CCF utilizando placas de gel de sílica. O sistema dissolvente consistia em 95:5 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$. Visualizaram-se as placas com vapor de iodo. Noutras experiências verificou-se que o ácido miristico (C14), o ácido palmítico (C16) e o ácido esteárico (C18) são difíceis de detectar nestas condições, e que dos áci dos gordos não saturados em C18 o oleico, o linoleico, o lino lénico não se separavam bem. No quadro 22, indicam-se as con dições e resultados (presença de espaços correspondentes aos ácidos gordos insaturados em C18, ésteres tri, di e mono gli ceridicos do ácido oleico) utilizando azeite, óleo de milho e ácido oleico como substratos.

QUADRO 22

<u>Substratos:</u>	<u>azeite</u>				<u>óleo de milho</u>				<u>ácido oleico</u>			
	C18	tri	di	mono	C18	tri	di	mono	C18	tri	di	mono
apenas substrato		+				+				+		
substrato + CSC-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Substrato + CSC-2 + KPG	+				+				+	+	+	+
Substrato + CSC-1	+	+	+	+	+				+			
Substrato + CSC-1 + KPG	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
substrato + Lipase MY	+	+	+	+	+	+			+			
Substrato + Lipase MY + KPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Exemplo 45

Para se determinar o efeito de outros óleos naturais (ésteres triglicéridicos do ácido oleico e de outros ácidos), na hidrólise do moniglicérido de cetropreno com CSC-2, efectuou-se uma série de ensaios.

Pesaram-se 50 mg de KPG em balões de Erlenmeyer. Adicionou-se 1 mg de CSC-2 em 1 ml de tampão $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 100 mM, a pH 5,5 e, 20 μl de óleo, com 9 ml de tampão. Incubaram-se os balões a 35°C , a 250 rpm, durante 23 horas. Pôs-se termo às reacções por acidificação, extrafu-se com CHCl_3 e analisaram-se por CLAP, tal como no exemplo 18. Encontraram-se listados os aditivos assim com a sua composição percentual de glicéridos de ácido oleico. Obtiveram-se os resultados seguinte:

QUADRO 23

<u>Aditivo</u>	% de Oleatos		ee de ácido de <u>configuração S</u>
	<u>no óleo</u>	<u>% de Ácido</u>	
0		32	97
20 μl óleo de milho	43	41	96
20 μl óleo de amendoim	42-61	42	96
20 μl óleo de soja	23-31	41	96
20 μl de óleo de			
banha de porco	38-44	40	96
20 μl de azeite	64-84	41	96

Exemplo 46

Preparação de cetoprofeno de configuração S na presença de aditivos.

Para se determinar os problemas associados com o facto de existirem ácido oleico ou ésteres de oleatos no meio reaccional, efectuou-se o seguinte ensaio. Adicionaram-se a balões de Erlenmeyer de 250 ml, 5 g de KPG, 50 mg de enzima CSC-2 e 5 gramas de oleatos (óleos ou ácido oleico). Colocaram-se os ba-lões numa incubadora, a 35°C , a 250 rpm, e efectuou-se uma amostragem da mistura reaccional recolhendo alíquotas de 200 μl

em diversos momentos. Analisaram-se estas alíquotas por CLAP (coluna ODS-3 RAC, utilizando $\text{CH}_3\text{OH}:(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM (60:40), como eluente a um débito de 4 ml/minuto, detecção a 254 nm) para se determinar a evolução da reacção. Quando se havia produzido, aproximadamente 40% de ácido, pôs-se termo às reacções colocando os balões no congelador a -70°C . Utilizaram-se dois procedimentos de extracção para se determinar o melhor método para se isolar o cetoprofeno de configuração S, isento de ácido oleico. A primeira (que se indica como procedimento de extracção I, no quadro que se segue) envolveu, em primeiro lugar a alcalinização da solução (pH 10) com NaOH, depois, extracção com hexano e depois com CHCl_3 . Depois acidificou-se a camada aquosa para pH 1,5, com HCl, extraíu-se com hexano e depois com CHCl_3 . Depois agregaram-se as fracções contendo cetoprofeno, extraíram-se com CHCl_3 e eliminou-se o ácido de cetoprofeno com NaHCO_3 a 5%. Depois extraíu-se com CHCl_3 , evaporou-se e cristalizou-se utilizando etanol. Como se pode verificar no quadro seguinte (quadro 24) o ácido oleico não se separou completamente do cetoprofeno. Extraíram-se os outros balões utilizando o procedimento de extracção II. Acidificaram-se em primeiro lugar as soluções (pH 1,5) com HCl 6N e extraíu-se o ácido de cetoprofeno com CHCl_3 . Eliminou-se, então, o ácido de cetoprofeno com NaHCO_3 a 5% que se acidificou depois e, se extraíu com CHCl_3 . Evaporou-se o CHCl_3 e recuperou-se o cetoprofeno. Por CCF sobre placas de sílica utilizando 95:5 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ e desenvolvimento de vapor de iodo, bem como por RMN verificou-se que o ácido de cetoprofeno continha < de 5% de ácido oleico. Indicam-se os resultados no quadro 24:

QUADRO 24

Procedimento	% de ácido	Proporção	Acido de			Extracção
		Final	Acido iso	configuração		
		uMole/hr/mg	lado (g)	S Isolado	% ee	
apenas CSC-2	40,5	0,53	0,86	95,8		II
+ azeite	37	1,1	1,07	95,4		II
+ácido oleico	39	1,2	?	88,		I
+óleo de milho	31	0,95	?	84,8		I
+Tween 80	34,9	0,46	0,78	94,3		II
+Span 85	28,9	0,87	0,84	95,1		II

Exemplo 47

Neste exemplo ilustra-se o efeito do óleo mineral sobre a hidrólise do monoglicérido de cetoprofeno com CSC-2.

Para se determinar se existia um efeito intensificador não específico dos óleos de parafina na proporção de conversão de KPG em KP por CSC-2, repetiu-se o procedimento de hidrólise enzimática do exemplo 44. Neste ensaio utilizou-se óleo mineral a 2% do volume de reacção. Pôs-se termo às reacções, decorridas 23 horas, acidificaram-se, extraíram-se com CHCl_3 e analisaram-se por CLAP tal como no exemplo 18. Não se observou um aumento significativo na proporção da produção de ácido, utilizando óleo mineral.

	<u>% de Acido</u>
CSC-2	29
CSC-2 + 200 μl de óleo mineral	30

Exemplo 48

Neste exemplo ilustra-se a especificidade do aumento da propor

ção de reacção de CSC-2 utilizando ácido oleico.

Para determinar o efeito dos compostos estreitamente ligados ao ácido oleico e aos seus ésteres, (para além dos tensioactivos já mencionados), efectuou-se uma série de ensaios, tal como no exemplo 40, incluindo a utilização de 200 μ l de DMF para solubilizar o substrato. Pôs-se termo às reacções nos momentos indicados, acidificaram-se, extraíram-se com CHCl_3 e analisaram-se por CLAP de acordo com o exemplo 18, com os seguintes resultados:

QUADRO 25

<u>Tempo</u> (hr)	<u>Aditivo</u>	<u>% de Acido</u>
18	0	23
"	200 μ l Triacetina	12
"	100 μ l Tributirina	3
23	0	29
"	200 μ l ácido linoleico	21
"	200 μ l éster metílico do ácido linoleico	34
"	200 μ l éster etílico do ácido linoleico	26
"	100 μ l dilinoleína	20
"	100 μ l trilinoleína	20
23	0	32
"	25 μ l monoestearina	31
"	25 μ l diestearina	30
"	28 μ l triestearina	25
"	200 μ l ácido linolénico	13

Exemplo 49

Este exemplo ilustra o efeito de aumento da proporção do ácido oleico sobre a lipase MY, CSC-1, e CSC-2.

Para se determinar qual o enzima que na preparação de lipase MY respondia ao ácido oleico e aos seus ésteres com um aumento da proporção de conversão de ésteres de, especialmente monoglicérido de cetoprofeno, em cetoprofeno, pesaram-se 50 mg de KPG na ausência de DMF, num balão, ao qual se tinha acidionado ou 1 mg de CSC-2 em 1 ml de tampão, ou 1 mg de CSC-1 em 1 ml de tampão, ou 50 mg de lipase MY em 1 ml de tampão. Adicionaram-se 9 ml de tampão $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 100 mM a pH 5,5) e 200 μl de ácido oleico, a alguns dos balões. Incubaram-se os balões a 35°C, a 250 rpm, durante 21 horas. Pôs-se termo às reacções por acidificação e extracção com CHCl_3 e analisaram-se por CLAP, tal como no exemplo 18.

Obtiveram-se os resultados apresentados no quadro 26.

QUADRO 26

<u>Enzima</u>	<u>Aditivo</u>	<u>% de Acido</u>	<u>% ee de ácido de configuração S</u>
50 mg Lipase MY	0	31	81
	200 μl ácido oleico	46	83
1 mg CSC-1	0	6	85
	200 μl ácido oleico	5	84
1 mg CSC-2	0	33	97
	200 μl ácido oleico	52	97

Exemplo 50

Neste exemplo demonstra-se o efeito do ácido oleico na taxa de hidrólise de diversos ésteres de cetoprofeno, pela lipase MY e pela lipase B de Candida (Biocatalyst).

Uma vez que o ácido oleico aumenta a taxa de conversão de KPG em KP, pela lipase MY e CSC-2, utilizou-se uma série de ésteres de cetoprofeno. Neste ensaio, faz-se a comparação entre o aumento, originado pelo ácido oleico, da taxa de conversão de diferentes ésteres de cetoprofeno pela lipase MY ou pela lipase B de Candida (Biocatalyst). Colocou-se num balão de Erlenmeyer éster de cetoprofeno (50 mg) e adicionaram-se 50 mg de lipase MY ou de Lipase Biocatalyst (que se repetiu, num dos casos descritos a 10 mg, 16 horas) em 1 ml de tampão, assim como 9 ml de tampão. Adicionou-se ácido oleico (200 μ l) a alguns balões. Incubaram-se as misturas reacionais a 35°C, 250 rpm, durante 17 horas, acidificaram-se, extraíram-se com CHCl_3 e analisaram-se por CLAP. Os dados indicam-se a seguir no quadro 27

QUADRO 27

<u>Ester de</u> <u>Cetoprofeno</u> <u>Substrato</u>	<u>Lipase MY</u>		<u>Lipase B de Cândida</u>	
	<u>Só % de</u> <u>ácido</u>	<u>+ácido oleico</u> <u>% de ácido</u>	<u>Só % de</u> <u>ácido</u>	<u>+ácido oleico</u> <u>% de ácido</u>
metilo	4	4	14	15
n-propilo	15	13	43	33
n-hexilo	4	7	26	15
2,22-tricloro-etilo	34	13	41	39
monoglicérido	23	40	44*	53*

* 10 mg, 16 hrs

Exemplo 51

Neste exemplo descreve-se o melhoramento na estereosselektividade e taxa de relação pelo ácido oleico, utilizando o éster 2-cloroetilico de cetoprofeno.

Efectuou-se um ensaio utilizando 50 mg de éster 2-cloroetilico de cetoprofeno (na ausência de DMF). Os enzimas utilizados foram 50 mg de Lipase MY ou 50 mg de Lipase B de Candida (Biocatalyst) ou 1 mg de CSC-1 ou de CSC-2, dissolvidos em 1 ml de tampão. Utilizou-se o ácido oleico para a 200 μ l e adicionaram-se 9 ml de tampão. Incubaram-se as misturas reaccionais a 35°C, a 250 rpm, durante 15,5 horas, acidificaram-se e extraíram-se com CHCl_3 . Efectuou-se a análise de acordo com o descrito no exemplo 18. Apresentam-se os dados obtidos, no Quadro 28

QUADRO 28Ester 2-cloro-etílico de cetoprofeno

<u>Enzima</u>	<u>Aditivo</u>	<u>% de Acido</u>	<u>% ee de ácido de configuração C</u>
50 mg Lipase MY	0	12	21
	200 µl ácido oleico	20	87
1 mg CSC-2	0	12	93
	200 µl ácido oleico	26	99
1 mg CSC-1	0	4	89
	200 µl ácido oleico	2	55
50 mg de Lipase B			
de <u>Candida</u>	0	8	25
	200 µl ácido oleico	9	85

Exemplo 52

Neste exemplo descreve-se o efeito do ácido oleico na taxa de reacção e estereoespecificidade de outros enzimas e de outros ésteres de cetoprofeno.

Para se determinar quando se podia utilizar o ácido oleico para aumentar a proporção/selectividade utilizando outra lipase e/ou substratos, efectuou-se o ensaio que se segue. Colocaram-se em balões de Erlenmeyer de 50 mg de éster monometílico de trietileno-glicol, de éster monoglicerídico ou de éster etileno glicólico. Adicionaram-se 50 mg de Lipase MY, 50 mg de lipase de *Mucor miehei*, 2,5 mg de lipase de Candida cylindracea (Biocatalyst) ou 50 mg de lipase OF, todas elas em 1 ml de tampão. Também se utilizaram 10 µl de estearase de fígado de porco. Adicionou-se o ácido oleico aos balões a 200 µl.

Adicionou-se o tampão para um volume final de 10 ml e incubaram-se os balões a 35°C, 250 rpm, acidificaram-se e extraíram-se com CHCl₃ e analisaram-se por CLAP tal como no exemplo 18. No quadro 29, apresentam-se os dados obtidos.

QUADRO 29

	Ester dieti- leno-glicóli- co de ceto- profeno		Ester mono- metilotrie- tileno-gli- cólico de cetoprofe- no		Ester monogli- cerídico de cetoprofeno		Ester etileno- -glicónico de cetoprofeno	
	% Acido	%ee	% Acido	%ee	% Acido	%ee	% Acido	%ee
Lipase MY	38	48	16	62	18	70	9	60
+ ácido oleico	41	66	16	81	37	82	27	95
Mucor mischei	24	41R	26	36R	20	40R	17	54R
+ ácido oleico	20	2R	6	1R	4	35R	10	42R
estearase de fígado de porcino	11	7	20	2R	10	36R	3	51R
+ ácido oleico	5	8	5	15	1	14R	3	64R
Biocatalisador								
Lipase de <u>Candida</u>	24	54	9	60	19	57	7	47
+ ácido oleico	33	53	10	70	34	78	25	91
Lipase OF	40	39	17	61	35	41	13	31
+ ácido oleico	48	60	18	81	48	69	39	88

Exemplo 53

Neste exemplo descreve-se o aumento originado pelo áci-
do oleico na hidrólise dos ésteres de cetoprofeno com enzimas im-
obilizados ou livres.

Adicionaram-se 200 mg de KPEG ou de KPG a um balão de

Erlenmyer, ao qual se adicionou 1 mg de CSC-2 livre em 1 ml de tampão ou 200 mg de CSC-2 imobilizado sobre gel de sílica (279-SD1), tal como no exemplo 24, pista 16 (que se determinou ser equivalente a 1 mg de enzima livre). Adicionou-se ácido oleico a 0,50, 200, 500 ou 1 000 μ l, e, tampão até um volume final de mistura reaccional de 10 ml. Decorridas 14 a 21 horas, pôs-se termo às reacções por acidificação e, extracção com CHCl_3 e determinou-se a percentagem de ácido e a percentamgem de ee, tal como no exemplo 18. No quadro 30 indicam-se os resultados obtidos.

QUADRO 30

<u>Enzima</u>	<u>Substrato</u>	Acido <u>oleico</u> (ul)	<u>% de ácido</u>	% ee de ácido de <u>configuração S</u>
CSC-2 Imobilizado	Ester etileno			
	glicólico de	0	2	95
	cetoprofeno	50	2	95
		200	5	97
		500	11	97
		1000	18	98
CSC-2 livre	Ester etileno			
	-glicólico de			
	cetoprofeno	0	3	93
		50	5	97
		200	12	98
		500	28	97
		1000	33	97
CSC-2 Imobilizado	Ester monogli			
	cérico de ce-			
	toprofeno	0	1	87
		50	2	92
		200	4	93
		500	5	92
		1000	7	92
CSC-2 livre	Ester monogli-	0	1	91
	cérico de ceto	50	3	93
	profeno	200	9	95
		500	15	94
		1000	21	96

Exemplo 54

Neste exemplo demonstra-se o efeito do ácido oleico, hexano e água na produção de cetoprofeno por CSC-2.

Para se determinar se era possível a trans-esterificação sem hidrólise enzimática e, também para se evitarem os problemas inerentes a um sistema multifásico de ácido oleico em tampão aquoso, tentou-se a conversão enzimática dos ésteres de cetoprofeno em cetoprofeno, em hexano e ácido oleico misturados em diversas proporções. Neste ensaio, utilizou-se KPEG a 200 mg, CSC-2 imobilizado sobre Sílica (279-SD1), tal como no exemplo 53, anterior, utilizado a 200 mg (equivalente a 1 mg de enzima livre) e hexano e ácido oleico utilizados a diversos níveis (desde 10 ml e 0 ml cada a 0 ml e 10 ml cada). Adicionou-se tampão a alguns balões a 50 μ l (0,5% do volume de reação). Incubaram-se os balões a 35⁰C, 250 rpm, e recolheu-se uma alíquota de 200 μ l, decorridas 17,30 horas, diluiu-se em metanol e injectou-se directamente em CLAP. A coluna normalizada ODS-3 RAC com CH₃OH: (NH₄)H₂PO₄ 10 mM (60:40) como eluente a um débito de 4 ml/minuto e utilizou-se a detecção a 254 nm. Indicam-se a seguir os dados, no quadro 31:

QUADRO 31

Hexano	Acido oleico	Tampão	% de Acido	Proporção
<u>(ml)</u>	<u>(ml)</u>	<u>(μl)</u>		<u>μMole/hr/mg</u>
10	0	0	1	< 1
10	0	50 μ l	0	0
8	2	0	18	6
8	2	50 μ l	15	5
2	8	0	5	2
2	8	50 μ l	13	4
0	10	0	5	2
0	10	50 μ l	10	4

Exemplo 55

Neste exemplo descreve-se o efeito dos dissolventes orgânicos na produção de cetoprofeno.

Para se otimizar o dissolvente orgânico utilizado na presença de ácido oleico, utilizaram-se diversos dissolventes orgânicos, conjuntamente com uma diversidade de ésteres de cetoprofeno. Neste ensaio pesaram-se dentro de balões 50 mg de ésteres de cetoprofeno, conjuntamente com 1 ml de ácido oleico e 9 ml de um dissolvente orgânico. Taparam-se os balões e incubaram-se a 35°C, 250 rpm, durante 10-26 horas antes de se por termo à reacção, adicionando em 1º lugar 4 ml de CHCl₃ para solubilizar os substratos e produtos, depois filtrando através de um filtro Gelman Nylaflo 0,2 µm. Diluíram-se as amostras em metanol e analisaram-se por CLAP tal como no exemplo 18. Efectuou-se também o ensaio utilizando 200 µl de ácido oleico e 10 ml de tampão, que se acidificou, extraíu com CHCl₃ e se analisou por CLAP, como anteriormente. Indicam-se os dados a seguir, no quadro 32:

QUADRO 32

	10 ml de tampão OA	9 ml de hexano	9 ml de tolueno	9 ml de iso- octano	9 ml de OA	9 ml de CHCl ₃
<u>Ester de Cetoprofeno</u>	<u>200µl</u>	<u>OA 1 ml</u>	<u>OA 1 ml</u>	<u>1 ml</u>	<u>OA 1 ml</u>	
	% ácido (% ee)	% ácido (% ee)	% ácido (% ee)	% ácido (% ee)	(% ee)	% ácido (% ee)
éster etileno-glicólico	21 (98)	29 (95)	0	47 (98)*		0
éster monoglicérido	26 (96)	47 (97)	0	31 (96)		0
éster-2-cloroetilico	18 (96)	7 (92)	1 (<1%)	18 (97)		2 (3)
éster dietileno-gli- cólico	32 (30)	56 (13)*	N.D.	60 (17)*		N.D.
éster metílico	2 (96)	0,8	0	2 (93)		0

* Pôs-se termo à reacção às 10 H

ND - Não determinado

OA - Acido oleico

Exemplo 56

Uma vez que KPG e KPEG parecem ser os ésteres mais eficazes nos dissolventes orgânicos, efectuou-se uma experiência utilizando KPG e KPEG como substratos e uma diversidade de dissolventes orgânicos ou de tampões todos na presença de 1 ml de ácido oleico.

Colocaram-se em balões de Erlenmeyer 50 mg de KPG ou de KPEG assim como 100 mg de CSC-2 imobilizado sobre Sílica (279-SD-1) equivalente a 0,5 mg de enzima livre. Adicionou-se 1 ml de ácido oleico, tal como 9 ml de tampão ((NH₄)H₂PO₄) 100 mM, pH 5,5 ou de dissolvente orgânico. Colocaram-se os balões numa incubadora a 35°C e, agitaram-se a 250 rpm, durante 13 horas.

Pôs-se termo à reacção mediante a adição de 5 ml de CHCl_3 para solubilizar o material orgânico e filtraram-se as soluções utilizando membranas Gelman Nylaflo 0,2 μm para eliminar o enzima. Analisaram-se amostras numa coluna ODS-3 RAC utilizando $\text{CH}_3:\text{OH}:(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, 10 mM (60:40) como eluente, a um débito de 4 ml/minuto e efectuou-se a detecção a 254 nm. Determinou-se a percentagem de ee pela resolução das amidas diastereoméricas no sistema CLAP anterior, tal como no exemplo 18. Indicam-se os resultados no quadro 33:

QUADRO 33

Solvente 9 ml/1 ml	Ester mono- noglicérido cetoprofeno % de ácido	% ee do ácido de configu- ração S	éster etileno -glicol de ce toprofeno % de ácido	% ee de ácido de configura- ção S
Tampão/ácido oleico	17	97	19	97
Hexano/ácido oleico	12	94	16	87
Iso-octano/ácido oleico	39	98	48	97
Ciclo-hexano/ácido oleico	38	98	29	83
Ciclo-hexano/ácido oleico	12	94	3	52
Ciclo-octeno/ácido oleico	38	98	16	92
Tetra-hidro-naftaleno/áci do oleico	2	68	1	1
1,1,1,Tricloro-etano/ácido oleico	1	0	0	0
Tetracloro-etileno/ácido oleico	1	0	0	0

Exemplo 57

Ensaçou-se uma outra lipase de C. rugosa, Enzeco Rxx, que se encontra disponível no Enzyme Development Corporation, por SDS-PAGE e FIE. A SDS-PAGE demonstrou que o peso molecular de Enzeco Rxx era ligeiramente superior ao de CSC-2 (figura 12). No entanto, o FIE demonstrou uma banda principal no mesmo ponto isoeléctrico de CSC-2.

A avaliação da actividade de Enzeco Rxx com KPG ou com KPEG (50 mg) em 10 ml de tampão $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 100 mM,

a pH 5,5, com ou sem a adição de 200 μ l de ácido oleico, por um período de incubação de 18 horas a 35°C e a 750 rpm proporcionou os resultados indicados no quadro 34.

QUADRO 34

Enzima	Ácido Oleico adição	KPG		% ee do ácido de configuração S	KPEG		% ee do ácido de configuração S
		% de ácido do formado	Proporção (μ Mole/hr/mg)		% de ácido do formado	Proporção (μ Mole/hr/mg)	
CSC-2	200 μ l	44	4	98	60	5	97
CSC-2	0	75	1	95	20	2	93
Enzeco							
Rxx	200 μ l	33	3	66	36	3	83
Enzeco							
Rxx	0	33	3	22	20	20	19

Exemplo 58

Neste exemplo descreve-se a separação e purificação dos isóenzimas da lipase MY utilizando a focalização isoelétrica.

Como um método alternativo para a utilização de colunas de permuta de iões, utilizou-se uma célula preparatória de focalização isoelétrica (FIE), para separar os isóenzimas da lipase MY com base nas suas cargas individuais. Liofilizou-se a lipase MY que tinha sido previamente dessalinizada numa coluna Trisacryl GF-05 e dissolveram-se 400 mg em 50 ml de água desionizada com 2 ml de anfólitos de pH 2,5-5. Colocou-se esta amostra numa célula preparatória de FIE e fez-se incidir 12 watts, a 4°C, durante 4 horas. Não se estabeleceu qualquer limite eficaz para a voltagem e para a corrente (3000 volts e 150 mAmps,

como máximo). Decorridas 4 horas, recolheram-se as amostras por aspiração em vácuo e determinou-se o seu pH e conteúdo proteico sem qualquer diálise (para remover os anfólitos) das fracções. Os resultados encontram-se no gráfico da figura 13. Um gel FIE analítico das fracções a pH compreendido entre 3 e 9 mostrou a separação obtida da lipase CSC-2 (fracções 8-12) e da lipase CSC-1 (fracções 13-17). Como demonstração da actividade das fracções, ensaiou-se 1 ml de determinadas fracções quanto à sua actividade hidrolítica estereoespecífica em tampão aquoso, contra 50 mg de éster monoglicerídico de cetoprofeno na presença ou ausência 200 μ l de ácido oleico, tal como no método do exemplo 18. No quadro 35, a seguir, apresenta-se a actividade e a percentagem de ee.

QUADRO 35

<u>pH</u>	<u>Fracção %</u>	<u>Ácido</u>	<u>% ee ácido de configuração S</u>
3,9	2	3	63
	2 + ácido oleico	6	86
4,15	4	8	92
	4 + ácido oleico	23	96
4,1	5	4	85
	5 + ácido oleico	14	94
4,2	7	8	90
	7 + ácido oleico	30	96
4,3	9	18	96
	9 + ácido oleico	43	98
4,4	11	11	95
	11 + ácido oleico	40	97

Exemplo 59

Neste exemplo ilustra-se a utilização da lipase AY para a preparação de CSC-1 e CSC-2.

Solubilizaram-se 30 mg de lipase AY (Amano) em 40 ml de água desionizada e dialisaram-se num saco de diálise de transição de 2 000 m.w., 2 vezes, em 10 ml de água desionizada, durante 18 horas. Centrifugou-se, a 750 rpm, durante 20 minutos, o material retido e pôs-se de parte o sedimento. Efectuou-se, então a cromatografia do sobrenadante numa coluna de resina de troca de iões SP-Trisacryl M (13 X 25 cm). Equilibrou-se previamente a coluna SP-Trisacryl M com acetato de sódio 25 mM, a pH 3,3. Verteu-se o sobrenadante a 50 ml/hora; lavou-se a coluna com tampão de equilíbrio até à linha base e eluiu-se com tampão de acetato 25 mM a pH 4,6. Analisaram-se as fracções recolhidas durante o processo por FIE. Utilizando este procedimento isolaram-se eficazmente CSC-1 e CSC-2.

Exemplo 60

Neste exemplo ilustra-se mais uma vez que a estereosselectividade da lipase MY aumenta com a imobilização e a utilização.

Ensaaiaram-se 150 mg de lipase MY livre ou imobilizada, em 10 ml de tampão a pH 7 e 5 ml de HPPA-Me 1 M. O enzima imobilizado mostrou-se mais selectivo. No entanto, a hidrólise não terminou após o éster de configuração R ter sido completamente consumido.

QUADRO 36

Enzima livre versus. Enzima Imobilizado

Tempo	Livre	XAMA-2	XAMA-7
(hrs)	% R (% Conv)	% R (% Conv)	% R (% Conv)
4	73(16)	87(15)	84(17)

Exemplo 61Condições de Reacção

Num balão de Erlenmeyer de 500 ml colocou-se substrato e 400 mg de (R,S)-HPPA-Me e adicionaram-se 200 ml de tampão KH_2PO_4 0,20 M (pH 6,5), seguindo-se-lhe a adição de 0,3 g de lipase MY. Agitou-se a mistura a 250 rpm num agitador de Dubnoff, à temperatura ambiente (25°C), durante 21,5 horas. Recolheram-se amostras a intervalos de 0,5 horas de 0-6,5 horas e depois às 21,5 horas, para análise.

Optimização do pH

Adicionou-se 196 mg, de (R,S)-HPPA-Me, a uma série de soluções de 100 ml de tampão de fosfato, encontrando-se o pH no intervalo compreendido entre 4 e 8,5 com aumentos de 0,5 unidades, em balões de 250 ml. Agitaram-se as misturas durante 20 minutos para solubilizar o éster. Preparou-se uma solução de 1mg/ml de lipase MY, centrifugou-se a 7500 rpm, durante 20 minutos e adicionou-se 0,5 ml deste sobrenadante a cada um dos balões. Colocaram-se os balões num misturador de Dubnoff, à temperatura ambiente e efectuou-se uma amostragem, decorridas 7 horas para se determinar a percentagem de conversão de (R,S)-HPPA-Me em (R)-HPPa e a pureza enantiomérica do produto final.

O Efeito de Elevadas concentrações de (R,S)-HPPA-Me

Combinou-se (R,S)-HPPA-Me (1,5 moles) com 1 litro de tampão de fosfato 0,5 M, a pH 7,0. Controlou-se a temperatura da reacção entre 40^o e 45^oC em banho maria e adicionou-se em seguida 1 g de lipase MY. Agitou-se mecânicamente a mistura reaccional, durante 114 horas e recolheram-se amostras em diversos intervalos de tempo para se determinar a pureza enantiomérica e a concentração de (R)-HPPA produzido.

Temperatura óptima

Colocou-se 240 mg de (R,S)-HPPA-Me num balão de Erlenmeyer de 2,1, com 1 litro de acetato de amónio 1 M, a pH 7,05, 150 ml de tolueno e 2 g de lipase MY. Manteve-se a temperatura da reacção a 12^o, 21^o, 35^o ou 45^oC através de um banho de arrefecimento com água fria ou através de um banho de aquecimento com água. Recolheram-se amostras da camada aquosa, a determinados intervalos de tempo, para se determinar a concentração total de HPPA produzido e as quantidades relativas de HPPA, com as configurações R e S.

Inibição do Produto

A. Inibição da actividade pelo álcool produzido após hidrólise.

Efectuaram-se duas reacções de hidrólise para se determinar o efeito do metanol, produzido como um produto secundário da hidrólise de HPPA-Me, sobre a actividade da lipase MY. Colocaram-se em balões com ou sem 0,75 moles de metanol, 1,5 moles de (R,S)-HPPA-Me, 1 litro de NH₄OAc 1 M, a pH 6,5, 150 ml de tolueno e 2 g de lipase MY. Agitaram-se lentamente as misturas e recolheram-se amostras a diversos intervalos de tempo para se determinar as concentrações de cada um dos estereoisómeros de HPPA que se haviam produzido.

B. Inibição da actividade por (R)-HPPA.

Para se determinar o efeito do (R)-HPPA produzido durante a hidrólise de (R,S)-HPPA-Me sobre a actividade da lipase MY, efectuou-se uma série de três ensaios. Combinaram-se 200 ml de acetato de amónio 0,04 M, a pH 7,0, com 30 ml de tolueno, 40 mmoles de (R,S)-HPPA-Me, 25 mg de lipase MY e (R)-HPPA 0,30, ou 100 mM. Agitaram-se lentamente as misturas reaccionais, durante 136 horas e recolheram-se amostras a diversos intervalos de tempo para se determinarem as concentrações de cada estereoisómero de HPPA que se havia produzido.

C. Efeito de Diluição

Para se determinar o efeito da concentração do substrato na actividade da lipase MY, efectuaram-se reacções contendo 25, 175, ou 375 ml de água, 0,04 moles de HPPA-Me, 0,04 moles de acetato de amónio (pH ajustado para 7,0), 30 ml de tolueno e 25 mg de lipase MY dissolvida em 25 ml de água. Agitaram-se as misturas reaccionais durante 164 horas. Analisaram-se amostras da camada aquosa a diversos intervalos de tempo, para se determinarem as concentrações de cada um dos estereoisómeros de HPPA que se haviam formado.

Recção à Escala do Quilograma

Agitaram-se 25 g de lipase MY em 1 litro de acetato de amónio 0,2 N, a pH 6,5, durante 20 minutos, centrifugaram-se a 10 000 X g e adicionou-se o sobrenadante a 1,176 Kg de (R,S)-HPPA-Me em 9 litros de água, 2,5 litros de tolueno e agitou-se a mistura lentamente, durante 29 horas. Recolheram-se periodicamente amostras e analisaram-se por CLAP. No final da reacção aspirou-se a fase aquosa e extraíu-se com CH_2Cl_2 . Ajustou-se então a fase aquosa para pH 2,1 e extraíu-se com acetato de eti-

lo. Adicionou-se sulfato de magnésio para eliminar os vestígios de água. Eliminou-se o acetato de etilo no vácuo e obteve-se o produto sob a forma de um pó de aspecto castanho claro.

Resultados

As condições dadas pela CLAP proporcionam a separação na linha base do éster de cada um dos ácidos enantioméricos (figura 14). (R,S)-HPPA-Me eluído a 1,3 minutos, (R)-HPPA eluído a 8,8 minutos e (S)-HPPA eluído a 12,4 minutos.

Nas condições de reacção iniciais obteve-se uma pureza óptica de ee de 88%, após hidrólise a 35% de (R,S)-HPPA-Me.

Indica-se no quadro 39 o efeito do pH na taxa de hidrólise e na enantioespecificidade. O pH óptimo para a taxa de hidrólise enzimática foi de 8,0, em que se atingiu 51% da conversão, após 7 horas de tempo de reacção (146,6 $\mu\text{M}/\text{hora}/\text{mg}$). A taxa óptima encontrava-se claramente nítida sendo as proporções de hidrólise praticamente as mesmas compreendidas no intervalo compreendido entre 6,5 e 8,5. O pH óptimo para a enantiosselectividade ocorreu entre pH 3 -4, em que o ee era de 88% para (R)-HPPA. No entanto, a selectividade a estes níveis de pH era baixa. Todos os outros ensaios decorreram a pH 6,5, no sentido de se conservar a actividade adequada e a pureza enantiomérica. Os controlos sem enzimas demonstraram que os valores de pH superiores a 7 originaram um acréscimo na hidrólise química de (R,S)-HPPA-Me e decréscimo da pureza enantiomérica. A pureza enantiomérica de HPPA produzido também decresceu à medida que a percentagem de conversão se aproximava de 50% (figura 15). Isto deve-se à especificidade incompleta da lipase MY para o Substrato HPPA-Me.

Efectuou-se um ensaio para se determinar o efeito de

uma solução aquosa saturada de (R,S)-HPPA-Me sobre a actividade do enzima e sobre a pureza enantiomérica do produto. A solubilidade de HPPA é inferior a 25 mM a pH 6,5, em solução aquosa, enquanto que HPPA possui uma elevada solubilidade em solução aquosa a pH 6,5. A enantiosselectividade e a actividade do enzima sofreram quando se saturou a solução com (R,S)-HPPA-Me. A enantiosselectividade do enzima numa solução saturada de (R,S)-HPPA-Me foi completamente destruída. A actividade do enzima no substrato (R,S)-HPPA-Me 25 mM, a uma conversão de 4% foi de 6,5 mmoles/hora/mg. Por comparação com os dados do substrato saturado (quadro 38), a actividade foi 6,5 vezes superior, com uma solução de HPPA-Me 25 mM.

Verificou-se que a temperatura óptima para hidrólise enzimática de (R,S)-HPPA-Me a pH 7,0 e hidrólise a 20%, era de 21°C (quadro 39). A actividade inicial é substancialmente superior a 35°C ou a 45°C, tal como se esperava, contudo, a actividade decresce rapidamente indicando a inactivação do enzima. Não há variação na enantiosselectividade do enzima com base nas diferenças na temperatura da reacção.

Ensaíram-se de modo independente, os produtos da hidrólise de HPPA-Me, metanol e HPPA, para se determinarem os seus efeitos na actividade do enzima. A introdução de 0,5 equivalentes de metanol no início da reacção de hidrólise originou um decréscimo de 39% na actividade do enzima (figura 16). Concentrações sucessivamente aumentadas de HPPA demonstraram um decréscimo correspondente na actividade do enzima.

O efeito da diluição na actividade do enzima num sistema bifásico, está indicado na figura 17. A taxa encontra-se substancialmente aumentada pela diluição da fase aquosa, apesar

do éster residir quase exclusivamente na camada de tolueno.

Numa reacção à escala do quilograma, aplicando as condições óptimas anteriormente obtidas, a pureza óptica do (R)-HPPA produzido foi de 84% de ee a uma conversão de 39%, figura 18. A pureza óptica do produto assim obtido podia ser aumentada por recristalização no seio de diversos dissolventes orgânicos incluindo o acetato de etilo e o clorofórmio.

QUADRO 37

Actividade e Enantioespecificidade da Lipase MY em Função do pH da Solução

<u>pH</u>	<u>% de Conversão</u>	<u>Actividade</u> ($\mu\text{mol/hr/mg}$)	<u>% ee</u>
3,0	34	96	89
4,0	33	95	88
4,5	35	100	87
5,0	36	103	86
5,5	38	109	84
6,0	42	121	80
6,5	47	134	78
7,0	46	133	77
7,5	50	142	76
8,0	51	147	67
8,5	48	136	52

Fizeram-se reagir, durante 7 horas, 196 mg de (R,S)-HPPA-Me, 100 ml de tampão de fosfato com o pH indicado e 0,5 ml de uma solução de 1 mg/ml de lipase MY, preparada por centrifugação a 7500 rpm, durante 20 minutos, e analisaram-se por CLAP.

QUADRO 38

Efeito da Saturação com (R,S)-HPPA-Me Sobre a Actividade Enzimática

Tempo (Hrs)	[HPPA] (mM)	Actividade de (% de Conversão) $\mu\text{M/hr/mg}$	(R)-HPPA ee %
18	19,8	1,1 (2)	18
45	41,4	.92 (4)	8
65	66,2	1,0 (7)	4
114	114	.8 (11,4)	6

Agitaram-se mecânicamente (R,S)-HPPA-Me (1,5 moles) em 1 litro de tampão fosfato 0,5 M, a pH 7,0 a 40^o-45^oC e 1 g de Lipase MY, durante 114 horas e, analisaram-se as amostras por CLAP, conforme se indicou na figura 1.

QUADRO 39

Efeito da temperatura na Actividade e Enantioespecificidade

Tempo (Hrs)	12 ^o C [HPPA]	ee (%)	21 ^o C [HPPA]	ee (%)	35 ^o C [HPPA]	ee (%)	45 ^o C [HPPA]	ee (%)
1	-	-	-	-	28	94	31	92
3	-	-	-	-	67	96	52	92
20	-	-	-	-	154	92	101	90
31	115	90	178	-	-	-	-	-
44	201	92	255	94	209	92	162	90
51	202	92	269	94	-	-	-	-
69	227	92	248	90	-	-	-	-
88	253	92	289	88	-	-	-	-

Conservaram-se à temperatura indicada, 294 g de HPPA-Me, 1 litro de acetato de amônio 1 M, a pH 7,05, 150 ml de tolueno e 2 g de lipase MY. Analisaram-se as amostras da camada aquosa, conforme indicado na figura 1.

As figuras anexas são as seguintes:

Lista de Figuras

- Figura 1 SDS-PAGE de lipase MY, lipase AY e lipase Biocatalyst.
- Figura 2 Gel FIE, pI 3-9 das lipases comerciais de C.rugosa.
- Figura 3 Cromatografia SP-Trisacryl M de lipase MY
- Figura 4 Gel FIE, pI 3-9 de SP-Trisacryl M de fracções da coluna de lipase MY
- Figura 5 Cromatografia SP-Sephadex da lipase MY
- Figura 6 Gel de FIE, pI 3-9 de fracções de lipase MY de uma coluna de cromatografia SP-trisacryl LS.
- Figura 7 Cromatografia SP-Trisacryl LS de lipase MY
- Figura 8 Efeito dos ácidos orgânicos na imobilização da lipase MY.
- Figura 9 Efeito do ácido esteárico (0-20%) na imobilização da lipase MY.
- Figura 10 Efeito do ácido esteárico (0-10%) na imobilização da lipase MY.
- Figura 11 Estabilidade da lipase CSC-1 imobilizada.
- Figura 12 SDS-PAGE de lipases de C. rugosa, CSC-2 e Enzeco Rxx.
- Figura 13 Focalização Isoelétrica preparatória da lipase MY.
- Figura 14 Cromatograma.
- Figura 15 Conversão versus excesso enantiomérico
- Figura 16 HPPA produzido versus tempo
- Figura 17 HPPA produzido versus tempo
- Figura 18 Percentagem de conversão versus tempo

Legendas das Figuras

- Figura 1 SDS-PAGE de lipase MY, lipase AY e de lipase Biocatalyst. Pistas 1 e 4, lipase Biocatalyst; pistas 2 e 5, lipase AY (Amano); pistas 3 e 6, lipase MY (Meito Sangyo). (ver Ex. 1)
- Figura 2 Gel de FIE, pI 3-9 de lipases comerciais de C. rugosa. Fez-se percorrer o gel por 390 volts/hora. Pista 1, lipase da Sigma; pista 2, lipase OF; pista 3, lipase MY; pista 4, lipase AY; pista 5, lipase Biocatalyst; pista 6, padrões pI. (ver Ex. 10)
- Figura 3 Cromatografia SP-Trisacryl M da lipase MY (C. rugosa). Aplicou-se lipase MY (1,0 g) em NaH_2PO_4 25 mM, a pH 3,3, numa coluna de 2,5 X 20 cm, equilibrada com NaH_2PO_4 25 mM, a pH 3,3. Eluiu-se a proteína sob a forma de duas fracções utilizando tampão citrato-fosfato, a pH 4,75, seguido de tampão de citrato-fosfato, a pH 6,80 (ver Ex.11).
- Figura 4 Gel FIE, pI 3-9 de fracções de lipase MY numa coluna SP-Trisacryl M. Pista 1, lipase MY; pista 2, fracção ao longo da passagem; pista 3, pico 1 de proteína; pista 4, pico 2 de proteína; pista 5, pico 3 da proteína; pista 6, pI normalizadas 3-9; Corou-se o gel com prata. (ver Ex. 11).
- Figura 5 Cromatografia de SP-Sephadex de lipase MY (C.rugosa). Aplicou-se lipase MY (1,30 mg) em tampão de citrato-fosfato, a pH 3,3, a uma coluna 2,5 X 20 cm, no mesmo tampão. Eluição passo a passo, efectuada com tampão de citrato-fosfato, pH 4,70, seguida de tampão citrato-fosfato, a pH 6,80.

- Figura 6 Gel de FIE, pI 3-9 de fracções de lipase MY numa coluna de SP-Trisacryl LS. Pistas 1 e 8 são padrões FIE pI; as pistas 2 e 3 são amostras de lipase MY; as pistas 4 e 5 são agregados de proteínas eluidas com tampão a pH 6,80 (CSC-1) pistas 6 e 7 são agregados de proteínas eluidas a pH 4,75 (CSC-2). Corou-se o gel com prata. (ver Ex. 13).
- Figura 7 Cromatografia SP-Trisacryl LS de lipase MY. A coluna (9 X 45 cm) foi equilibrada com fosfato de sódio 25 mM, a pH 3,2. Dissolveu-se a lipase MY (150 mg) em 3,0 litros de NaH_2PO_4 25 mM, a pH 6,5. Eliminaram-se os sólidos e ajustou-se o pH para 3. descrevem-se os detalhes de eluição na legenda da Figura 3. (ver Ex. 14).
- Figura 8 Efeito dos ácidos orgânicos na imobilização da lipase MY. Misturou-se lipase MY (0,45 g), Amberlite DP-1 (0,9 g) e XAMA-7 (100 mg) em 10 ml de tolueno contendo 30-50 mg de um ácido saturado. Após tratamento, hidratação e lavagem ensaiou-se o enzima para se observar a sua actividade na hidrólise do éster de HPPA-Me. (ver Ex. 26).
- Figura 9 Efeito do ácido esteárico (0-20%) sobre a imobilização da lipase MY. Imobilizou-se a lipase MY, conforme descrito na legenda da Figura 8, utilizando diversas concentrações de ácido esteárico. Ensaiou-se a actividade hidrolítica do éster de HPPA-Me (ver Ex. 27).
- Figura 10 Efeito do ácido esteárico (0-10%) na imobilização da lipase MY. Misturou-se lipase MY e resina DP-1

e liofilizaram-se a partir de um tampão a pH 4,5 antes de se adicionarem a tolueno, contendo XAMA-7 e ácido esteárico. Evaporou-se o dissolvente para se efectuar a polimerização. Ensaiou-se a actividade tal como descrito na legenda da Figura 8. (ver Ex. 28).

Figura 11 Estabilidade de CSC-1 de lipase imobilizado. Utilizou-se a lipase CSC-1 isolada, que se imobilizou utilizando XAMA-7 e resina Amberlite DP-1 (ver Ex. 13) como agente catalítico, para converter 25 mM de éster HPPA-Me. A coluna (1 X 24 cm) funcionou a 0,75 ml/minuto na presença de 1,0 g/l de ditionito de sódio. Ensaiou-se diariamente a actividade enzimática. (ver Ex. 33).

Figura 12 SDS-PAGE de lipases de C. rugosa, CSC-2 e Enzeco Rxx. Separaram-se amostras de proteína num gel de poliacrilamida de gradiente 8-15%. Pista 1, lipase Enzeco Rxx, pista 2, lipase CSC-2; pista 3, padrões de pesos moleculares. A banda principal de lipase de 60 Kdalton encontra-se assinalada com uma seta (ver Ex. 57).

Figura 13 Focalização isoeléctrica preparatória da lipase MY. Dessalinizou-se a lipase MY (400 mg) e eliminaram-se os sólidos. Ligou-se a amostra com 2 ml de anfólitos (pH 2,5-5) e fez-se incidir sobre ela 12 watts a 4°C, durante 4 horas.

Figura 14 Cromatograma de (R,S)-HPPA, (R)-HPPA e de (S)-HPPA. Condições de cromatografia: Coluna, Resolvozil BSA-7, Macherey-Nagel, fase móvel, n-propanol a 5%

(v/v) em KH_2PO_4 10 mM, tampão a pH 5,0; débito, 2,7 ml/minuto, temperatura 22°C, detecção UV a 220 nm.

- Figura 15 Efeito da abordagem do limite teórico da conversão em ee.
- Figura 16 Efeito de HPPA sobre a hidrólise de HPPA-Me. Combinaram-se 200 ml de acetato de amônio, 0,04 M, a pH 7,0, com 30 ml de tolueno, 40 mmoles de HPPA-Me, 25 mg de Lipase MY e a quantidade indicada de (R,S)-HPPA. Efectuaram-se amostragens das reações, conforme indicado e analisaram-se, tal como descrito na Figura 1.
- Figura 17 Efeito da diluição na taxa de enzima. Deixou-se reagir durante 164 horas, a quantidade de água indicada, 0,04 moles de HPPA-Me, 0,04 moles de acetato de amônio, a pH 7,30 ml de tolueno, e 25 mg de lipase MY, em 25 ml de água. Analisaram-se as amostras da camada aquosa tal como indicado na Figura 1.
- Figura 18 Produção à escala de quilogramas de (R)-HPPA. Deixaram-se reagir durante 29 horas, 25 g de lipase MY, 1 litro de acetato de amônio 0,2 N, pH 6,5, 9 litros de água, 2,5 litros de tolueno e 1,176 Kg de (R,S)-HPPA-Me. Analisaram-se as amostras por CLAP, tal como indicado na Figura 1.

Como é evidente, a partir do anteriormente exposto, encontram-se contempladas diversas modificações na prática da presente invenção. O âmbito da presente invenção encontra-se, assim definido nas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para hidrolisar estéreo-selectivamente misturas racêmicas de ésteres de ácidos 2-substituídos, diferentes dos ácidos 2-halo-propiónicos, com elevado excesso enantiomérico, para proporcionar diversos ácidos, caracterizado por se fazer contactar essa mistura racêmica com uma lipase de Candida rugosa na presença de um solvente orgânico.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o solvente orgânico ser um solvente orgânico aromático.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo facto de o solvente orgânico aromático ser o tolueno.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o éster referido ser um éster do ácido 2-ariloxi-propiónico.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de o referido éster ser um éster do ácido 2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o referido éster ser o éster metílico ou o éster etílico do ácido 2-(4-hidroxifenoxi)-propiónico.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se imobilizar a referida lipase.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se imobilizar a lipase utilizando uma poliaziridina para a imobilização.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se imobilizar a referida lipase utilizando como suporte uma resina permutadora de iões.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a resina permutadora de iões ser substituída com um grupo ácido carboxílico.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se imobilizar a lipase na presença de um ácido orgânico.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de o ácido orgânico possuir uma cadeia com mais do que sete átomos de carbono.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o ácido orgânico possuir entre 12 e 18 átomos de carbono.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de o ácido orgânico ser o ácido esteárico.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de se adicionar um agente redutor.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de o agente redutor ser o hidro-sulfito de sódio, o sulfito de sódio ou um boro-hidreto.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo facto de o agente redutor ser o hidro-sulfito de sódio.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a lipase de Candida rugosa possuir a composição da lipase MY ou da lipase AY.

19.- Processo para a purificação de uma enzima, caracterizado pelo facto de se imobilizar uma mistura de enzimas.

20.- Processo para a purificação de uma enzima de Candida rugosa, caracterizado pelo facto de se imobilizar uma mistura de enzimas preparada a partir daquela.

21.- Processo para a purificação de uma enzima de Candida rugosa, caracterizado pelo facto de se imobilizar uma mistura de enzimas preparada a partir daquela e de se utilizar essa mistura repetidamente.

22.- Processo para a purificação de uma enzima de Candida rugosa, caracterizado pelo facto de se imobilizar uma mistura de enzimas preparada a partir daquela e de se utilizar essa mistura repetidamente num solvente orgânico.

23.- Processo de acordo com a reivindicação 20, caracteri-

zado pelo facto de a purificação proporcionar uma actividade acrescida.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de a purificação originar uma estéreo-selectividade acrescida.

25.- Processo para a purificação e para a separação de enzimas da lipase de Candida rugosa, caracterizado pelo facto de se utilizar cromatografia de permuta iónica e de se separar as isozimas de lipase resultantes recorrendo a um sistema de eluição apropriado.

26.- Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo facto de o esquema de eluição consistir num sistema de pH escalonado ou num sistema de gradiente de pH.

27.- Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de o sistema de eluição ser um sistema de pH escalonado.

28.- Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo facto de a referida cromatografia de permuta iónica utilizar um suporte cromatográfico transformado com um ácido forte.

29.- Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo facto de o suporte cromatográfico ser transformado com um grupo funcional sulfopropilo.

30.- Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de o suporte cromatográfico ser um polímero de N-acriloíl-2-amino-2-hidroxi-1,3-propanodiol transformado pelo grupo funcional sulfopropilo.

31.- Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de o suporte cromatográfico ser um dextrano de ligações reticulares transformado por um grupo funcional sulfopropilo.

32.- Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de o suporte cromatográfico ser um dextrano de ligações reticuladas com um polímero de N,N'-metileno-bis-acrilamida, transformado pelo grupo funcional sulfopropilo.

33.- Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de o suporte cromatográfico ser uma agarose transformada por um grupo funcional sulfopropilo.

34.- Processo para a purificação e para a separação de enzimas da ligase de Candida rugosa, caracterizado pelo facto de se



utilizar focalização isoelétrica.

35.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a lipase conter uma ou várias das isozi_{mas} possuindo a seguinte sequência de aminoácidos N-terminal:

Ala-Pro-Thr-Ala-U-Leu-Ala-Asn-Gly-V-

Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-

Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-

Pro-Pro-Y-Z-Asn-P

em que U, V, W, X, Y e Z representam aminoácidos e P representa a porção restante do péptido.

36.- Processo de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo facto de a lipase de Candida rugosa, ser a lipase MY ou a lipase AY.

37.- Processo para hidrolisar ésteres, para transesterificar ésteres ou ácidos ou para esterificar ácidos ou álcoois, caracterizado pelo facto de se fazer contactar o referido éster, ou ácido ou álcool com uma isozima de Candida rugosa.

38.- Processo para estéreo-selectivamente hidrolisar ésteres, transesterificar ésteres ou ácidos ou esterificar ácidos ou álcoois, caracterizado pelo facto de se fazer contactar esse éster, ácido ou álcool com uma isozima de Candida rugosa.

39.- Processo para hidrolisar ésteres, caracterizado pelo facto de se efectuar essa hidrólise na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 35.

40.- Processo para hidrolisar ésteres, caracterizado pelo facto de se efectuar essa hidrólise na presença de uma isozima de lipase possuindo a seguinte sequência de aminoácidos N-terminal:

Ala-Pro-Thr-Ala-Lys-Leu-Ala-Asn-Gly-V-

Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ale-Ile-Asn-

Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ala-Glu-

Pro-Pro-Val-Gly-Asn-P

em que V representa um aminoácido e P representa a porção restante do péptido.

41.- Processo para hidrolisar ésteres, caracterizado pelo facto de se efectuar essa hidrólise na presença de uma isozima de lipase possuindo a seguinte sequência de aminoácidos N-terminal:

Ala-Pro-Thr-Ala-Thr-Leu-Ala-Asn-Gly-Asp-
Thr-Ile-Thr-Gly-Leu-Asn-Ala-Ile-Ile-Asn-
Glu-Ala-Phe-Leu-Gly-Ile-W-X-Ala-Glu-
Pro-Pro-Y-Z-Asn-Leu-Phe-Ile-ZZ-Leu-P-

em que W, X, Y, Z e ZZ representam aminoácidos e P representa a porção restante do péptido.

42.- Processo de esterificação, caracterizado pelo facto de se efectuar essa esterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 38.

43.- Processo de esterificação, caracterizado pelo facto de se efectuar essa esterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 40.

44.- Processo de esterificação, caracterizado pelo facto de se efectuar essa esterificação na presença de uma isozima

de lipase conforme definida na reivindicação 41.

45.- Processo de transesterificação, caracterizado pelo facto de se efectuar essa transesterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 38.

46.- Processo de transesterificação, caracterizado pelo facto de se efectuar essa transesterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 40.

47.- Processo de transesterificação, caracterizado pelo facto de se efectuar essa transesterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 41.

48.- Processo para a hidrólise estéreo-selectiva de uma mistura racémica de ésteres, caracterizado pelo facto de se efectuar essa hidrólise na presença de uma isozima conforme definida na reivindicação 38.

49.- Processo para a hidrólise estéreo-selectiva de uma mistura racémica de ésteres, caracterizado pelo facto de se efectuar essa hidrólise na presença de uma isozima conforme definida na reivindicação 40.

50.- Processo para a hidrólise estéreo-selectiva de uma

mistura racêmica de ésteres, caracterizado pelo facto de se efectuar essa hidrólise na presença de uma isozima conforme definida na reivindicação 41.

51.- Processo para a transesterificação estéreo-selectiva de uma mistura racêmica de ésteres ou de ácidos, caracterizado pelo facto de se efectuar essa transesterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 38.

52.- Processo para a transesterificação estéreo-selectiva de uma mistura racêmica de ésteres ou de ácidos, caracterizado pelo facto de se efectuar essa transesterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 40.

53.- Processo para a transesterificação estéreo-selectiva de uma mistura racêmica de ésteres ou de ácidos, caracterizado pelo facto de se efectuar essa transesterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 41.

54.- Processo para esterificação estéreo-selectiva de uma mistura racêmica de álcoois ou de ácidos, caracterizado pelo facto de se efectuar essa esterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 38.

55.- Processo para a esterificação estéreo-selectiva de

uma mistura racêmica de álcoois ou de ácidos, caracterizado pelo facto de se efectuar essa esterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 40.

56.- Processo para a esterificação estéreo-selectiva de uma mistura racêmica de álcoois ou de ácidos, caracterizado pelo facto de se efectuar essa esterificação na presença de uma isozima de lipase conforme definida na reivindicação 41.

57.- Processo de acordo com as reivindicações 37-56, caracterizado pelo facto de se imobilizar a referida isozima.

58.- Processo de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo facto de se imobilizar a referida isozima utilizando uma poliaziridina para a imobilização.

59.- Processo de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo facto de se imobilizar a referida isozima utilizando como suporte uma resina permutadora de iões.

60.- Processo de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo facto de a resina permutadora de iões ser substituída com um grupo ácido carboxílico.

61.- Processo de acordo com a reivindicação 57, caracte

rizado pelo facto de se imobilizar a isozima na presença de um ácido orgânico.

62.- Processo de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo facto de o referido ácido orgânico possuir uma cadeia com mais do que 7 átomos de carbono.

63.- Processo de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo facto de o ácido orgânico possuir 12 a 18 átomos de carbono.

64.- Processo de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo facto de o ácido orgânico ser o ácido esteárico.

65.- Processo de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima na presença de álcool polivinílico.

66.- Processo de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima sobre sílica.

67.- Processo de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima definida na reivindicação 40.

...

68.- Processo de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima definida na reivindicação 41.

69.- Processo de acordo com as reivindicações 39-41 e 48-51, caracterizado pelo facto de se efectuar na presença de um solvente orgânico.

70.- Processo de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima.

71.- Processo de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima tal como se definiu nas reivindicações 58-66.

72.- Processo de acordo com as reivindicações 42-44 e 54-56, caracterizado pelo facto de se efectuar na presença de um solvente orgânico.

73.- Processo de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima.

74.- Processo de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima de acordo com as reivindicações 58-66.

75.- Processo de acordo com as reivindicações 45-47 e 51-53, caracterizado pelo facto de se efectuar na presença de um solvente orgânico.

76.- Processo de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima.

77.- Processo de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima conforme definida nas reivindicações 58-66.

78.- Processo para hidrolisar estéreo-selectivamente misturas racémicas de ésteres, caracterizado pelo facto de se fazer contactar essas misturas racémicas com uma isozima de lipase.

79.- Processo de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo facto de imobilizar a isozima de lipase.

80.- Processo de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo facto de efectuar na presença de um solvente orgânico.

81.- Processo de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo facto de o solvente orgânico ser o tolueno.

82.- Processo de acordo com as reivindicações 78-80, ca
racterizado pelo facto de a lipase ser a isozima de acordo com
as reivindicações 38 ou 40.

83.- Processo de acordo com a reivindicação 82, caracte
rizado pelo facto de a lipase ser a isozima de acordo com a rei
vindicação 40.

84.- Processo de acordo com as reivindicações 78-80, ca
racterizado pelo facto de o éster ser o éster de ácido 2-arilo-
xi-propiónico.

85.- Processo de acordo com a reivindicação 84, caracte
rizado pelo facto de o éster ser um éster do ácido 2-(4-hidro-
xi-fenoxi)-propiónico.

86.- Processo de acordo com a reivindicação 85, caracte
rizado pelo facto de esses ésteres serem os ésteres metílico ou
etílico do ácido 2-(4-hidroxi-fenoxi)-propiónico.

87.- Processo de acordo com a reivindicação 85, caracte
rizado pelo facto de se adicionar um agente redutor.

88.- Processo de acordo com a reivindicação 87, caracte
rizado pelo facto de o agente redutor ser o hidro-sulfito de sô

dio, o sulfito de sódio ou um boro-hidreto.

89.- Processo de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo facto do agente redutor ser o hidro-sulfito de sódio.

90.- Processo de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres dos ácidos 2-arilpropiónicos.

91.- Processo de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres dos ácidos 2-arilpropiónicos.

92.- Processo de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres dos ácidos 2-arilpropiónicos.

93.- Processo de acordo com as reivindicações 90-92, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima de acordo com as reivindicações 38, 40 ou 41.

94.- Processo para a transesterificação estéreo-seletiva de uma mistura racémica de ésteres de ácidos 2-arilpropiónicos, caracterizado pelo facto de se utilizar uma isozima de

lipase.

95.- Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo facto de se imobilizar a isozima.

96.- Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima de acordo com as reivindicações 38, 40 ou 41.

97.- Processo de acordo com a reivindicação 94, caracterizado por se utilizar um solvente orgânico.

98.- Processo de acordo com a reivindicação 92 ou 97, caracterizado pelo facto de o solvente orgânico ser um solvente orgânico alifático.

99.- Processo de acordo com as reivindicações 90-98, caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres de cetoprofeno.

100.- Processo de acordo com as reivindicações 90-93, caracterizado pelo facto de os ésteres de cetoprofeno serem os ésteres metílico, etílico, n-propílico, n-butílico, n-hexílico ou n-octílico ou qualquer outro éster alquílico.

...

101.- Processo de acordo com as reivindicações 90-98, caracterizado pelo facto de os ésteres de cetoprofeno serem ésteres substituídos por átomos de halogéneo tais como os ésteres 2-cloro-etílico, 2,2,2-tricloro-etílico ou 2,2,2-trifluoro-etílico.

102.- Processo de acordo com as reivindicações 90-98, caracterizado pelo facto de os ésteres de cetoprofeno serem os ésteres mono-glicerílico, 2-hidroxi-etílico, ésteres monometilícos de dietileno-glicol ou de trietileno-glicol ou outros ésteres hidroxilados.

103.- Processo de acordo com as reivindicações 90-98, caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres de ibuprofeno.

104.- Processo de acordo com as reivindicações 90-93, caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres de fenoprofeno.

105.- Processo de acordo com as reivindicações 90-93, caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres do ácido 2-fenilpropiónico.

106.- Processo de acordo com as reivindicações 90-93,

caracterizado pelo facto de os ésteres serem ésteres de indoprofeno.

107.- Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a estéreo-selectividade ou a velocidade da hidrólise de uma mistura de ésteres racémicos proporcionada por uma enzima ser aumentada ao adicionar-se um ácido gordo ou um éster de um ácido gordo.

108.- Processo de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo facto de a enzima ser uma isozima.

109.- Processo de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima definida nas reivindicações 38, 40 ou 41.

110.- Processo de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo facto de a enzima ser uma lipase.

111.- Processo de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo facto de a lipase ser uma lipase de Candida rugosa.

112.- Processo de acordo com as reivindicações 90-98, caracterizado pelo facto de se utilizar um aditivo constituído

por um ácido gordo ou por um éster de um ácido gordo quando se aumenta a velocidade ou a estereo-selectividade da reacção.

113.- Processo de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo facto de se seleccionar o aditivo entre estéres oleato, óleos vegetais, óleos de origem animal ou agentes tenso-activos contendo oleato.

114.- Processo de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo facto de o aditivo ser o ácido oleíco.

115.- Processo de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo facto de o aditivo ser o éster metílico do ácido linoleico.

116.- Processo de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo facto de o radical álcool do éster da mistura racémica conter um grupo de remoção de electrões.

117.- Processo de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo facto de o radical álcool do éster conter um ou vários grupos hidroxilo livres.

118.- Processo de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo facto de o radical álcool do éster ser um éster

2-cloro-etílico.

119.- Processo de acordo com a reivindicação 117, caracterizado pelo facto de a mistura racémica de ésteres ser composta por monoglicéridos de cetoprofeno, éster 2-hidroxi-etílico de cetoprofeno, éter mono-etílico de cetoprofeno-dietileno-glicol ou de cetoprofeno-trietileno-glicol.

120.- Processo de acordo com as reivindicações 92 ou 97, caracterizado pelo facto de o solvente orgânico ser o ácido oleico.

121.- Processo para hidrolisar mono- ou di- ou tri-glicéridos, caracterizado pelo facto de se utilizar uma isozi-ma de lipase livre ou imobilizada.

122.- Processo de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima de acordo com as reivindicações 38, 40 ou 41.

123.- Processo de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo facto de se utilizar um solvente orgânico.

124.- Processo para transesterificar mono-, di- ou tri-glicéridos, caracterizado pelo facto de se fazer contactar

esses gliceridos com uma isozima de lipase no estado livre ou no estado imobilizado.

125.- Processo de acordo com a reivindicação 124, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima definida nas reivindicações 38, 40 ou 41.

126.- Processo de acordo com a reivindicação 124, caracterizado pelo facto de se utilizar um solvente orgânico.

127.- Processo para a esterificação de álcoois mono-, di-, tri- ou poli-funcionais, caracterizado pelo facto de se fazer contactar esses álcoois com uma isozima de lipase no estado livre ou no estado imobilizado, na presença ou na ausência de um solvente orgânico.

128.- Processo de acordo com a reivindicação 127, caracterizado pelo facto de a isozima ser a isozima definida nas reivindicações 38, 40 ou 41.

129.- Processo de acordo com a reivindicação 127, caracterizado pelo facto de se utilizar um solvente orgânico.

Lisboa, 21 de Janeiro de 1991

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

R E S U M O

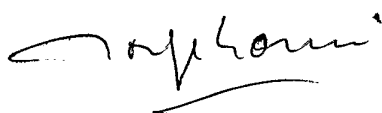
=====

"PROCESSO PARA O ISOLAMENTO, IMOBILIZAÇÃO
E UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS E ISOZIMAS PARA
A PREPARAÇÃO DE LIPASE A PARTIR DE
CANDIDA RUGOSA"

Descrevem-se processos para estéreo-selectivamente hidrolisar ésteres ou esterificar ácidos com diversas preparações de lipase de Candida rugosa em sistemas aquosos/orgânicos, em que o ácido não é substituído na posição 2 com um átomo de halogéneo. Estes processos são altamente estéreo-selectivos para a hidrólise e para a transesterificação de diversos ésteres. Descreve-se também um processo para a preparação do ácido R-2-(4-hidroxi-fenoxi)-propiónico com um excesso enantiomérico elevado utilizando uma enzima. Adicionalmente, descreve-se um processo para a separação e para a purificação de isozimas a partir da lipase de Candida rugosa por cromatografia e também por focalização isoeléctrica. Proporciona-se a composição da substância que constitui duas destas isozimas. Descreve-se também a utilização destas isozimas para a hidrólise de ésteres, para a transesterificação de ésteres e para a esterificação de ácidos. Além disso, proporciona-se a utilização destas isozimas para estéreo-selectivamente

hidrolisar, esterificar ou transesterificar. Faz-se a descrição de métodos de imobilização e a utilização de isozimas imobilizadas e também de lipase imobilizada de Candida rugosa. Apresenta-se um método para a purificação da actividade da enzima por imobilização. Faz-se também a descrição da utilização de agentes redutores para estabilizar as hidrólises enzimáticas. Descreve-se ainda a utilização de enzimas, isozimas e suas formas imobilizadas na presença de solventes orgânicos. Faz-se a descrição de processos para a produção estéreo-selectiva de ácidos substituídos por grupos ari-loxi na posição 2 e para a produção do ácido R-2-(4-hidroxi-feno-xi)-propiónico. Descreve-se ainda a produção estéreo-selectiva de ácidos 2-arylpropiónicos proporcionada por isozimas e descrevem-se processos para a preparação de S-cetoprofeno, S-ibuprofeno, S-fenoprofeno, ácido S-2-fenilpropiónico e de S-indoprofeno recorrendo a esta via. Proporciona-se também um método para aumentar a velocidade ou a estéreo-selectividade de uma reacção indirectamente veiculada por uma lipase.

Lisboa, 04 de Junho de 1990.
Agente Oficial das Propriedades Industriais

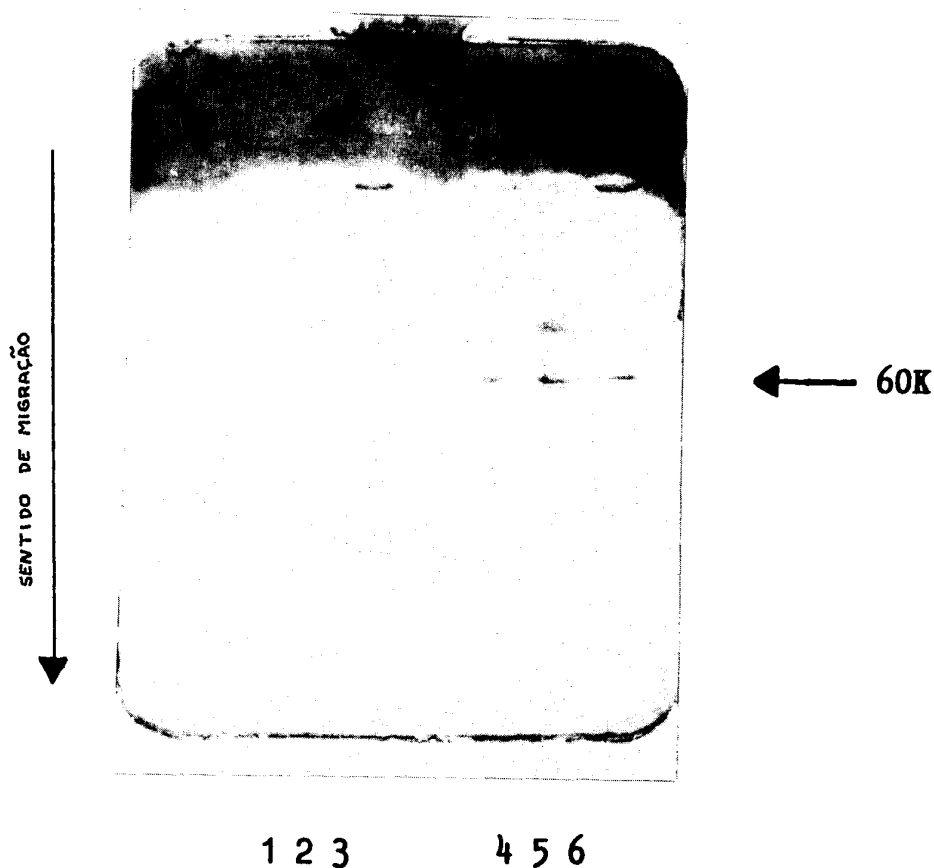


6.

FIG. 1

SDS-PAGE DE LIPASE MY, DE LIPASE AY E DE LIPASE BIOCATALYST

SDS-PAGE 10-15% GEL



4.

FIG. 2

GEL IEF, pI 3-9 DAS LIPASES COMERCIAIS DE C. RUGOSA



1 2 3 4 5. 6

FIG. 3

CROMATOGRAFIA SP-TRISACRYL M DE LIPASE MY

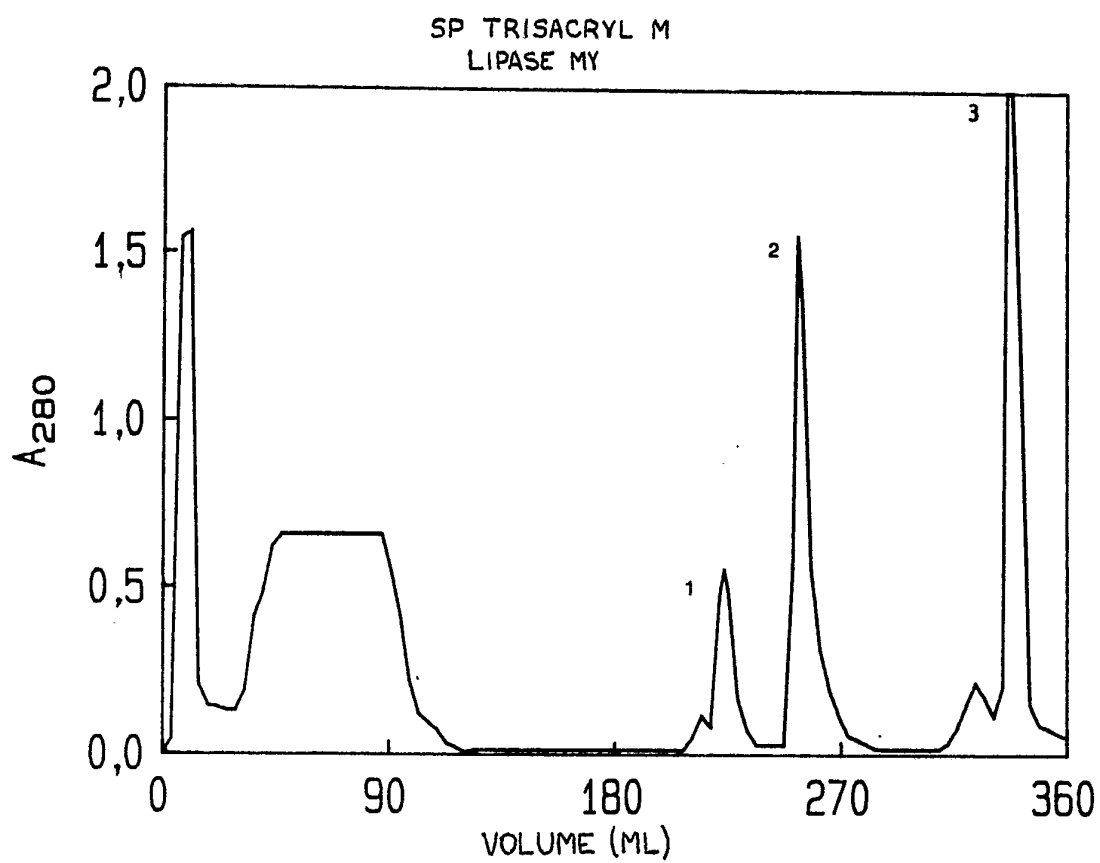


FIG. 4

GEL IEF, pI 3-9 DE FRACÇÕES DE UMA COLUNA SP-TRISACRYL M DE LIPASE MY

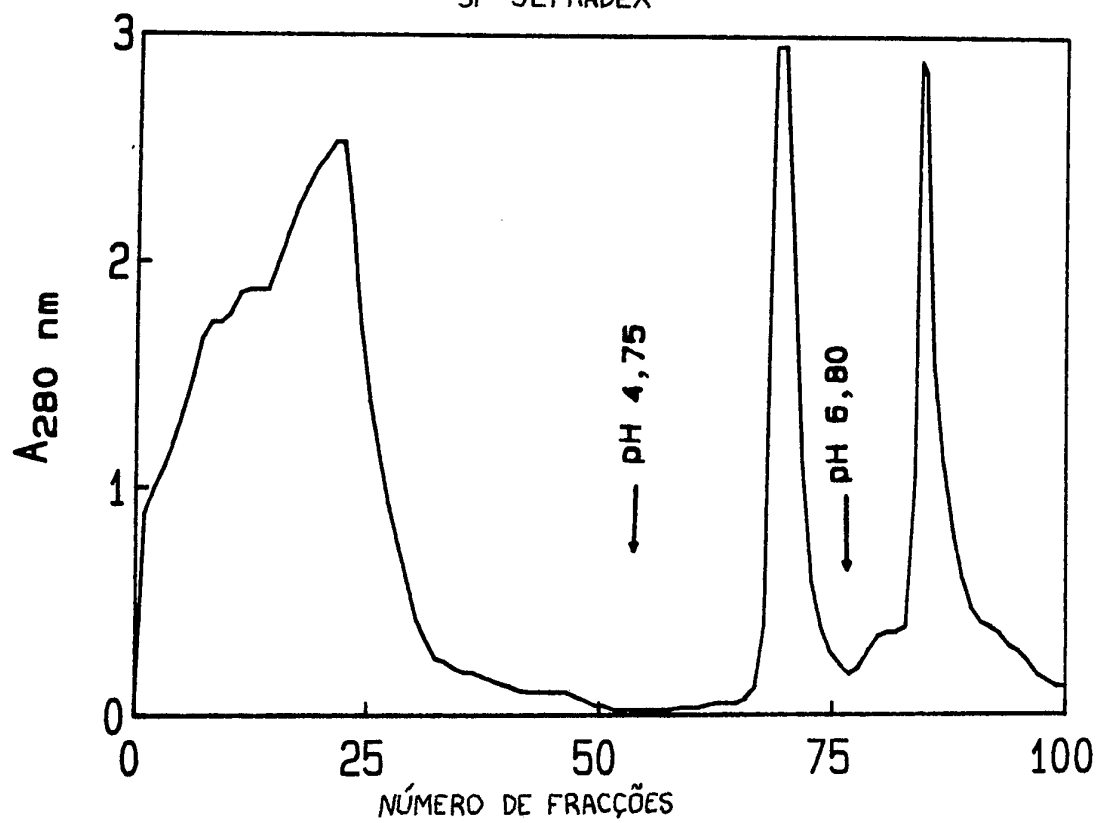


1 2 3 4 5 6 7

FIG. 5

CROMATOGRAFIA SP-SEPHADEX DE LIPASE MY

CROMATOGRAFIA
SP-SEPHADEX



4.

FIG. 6

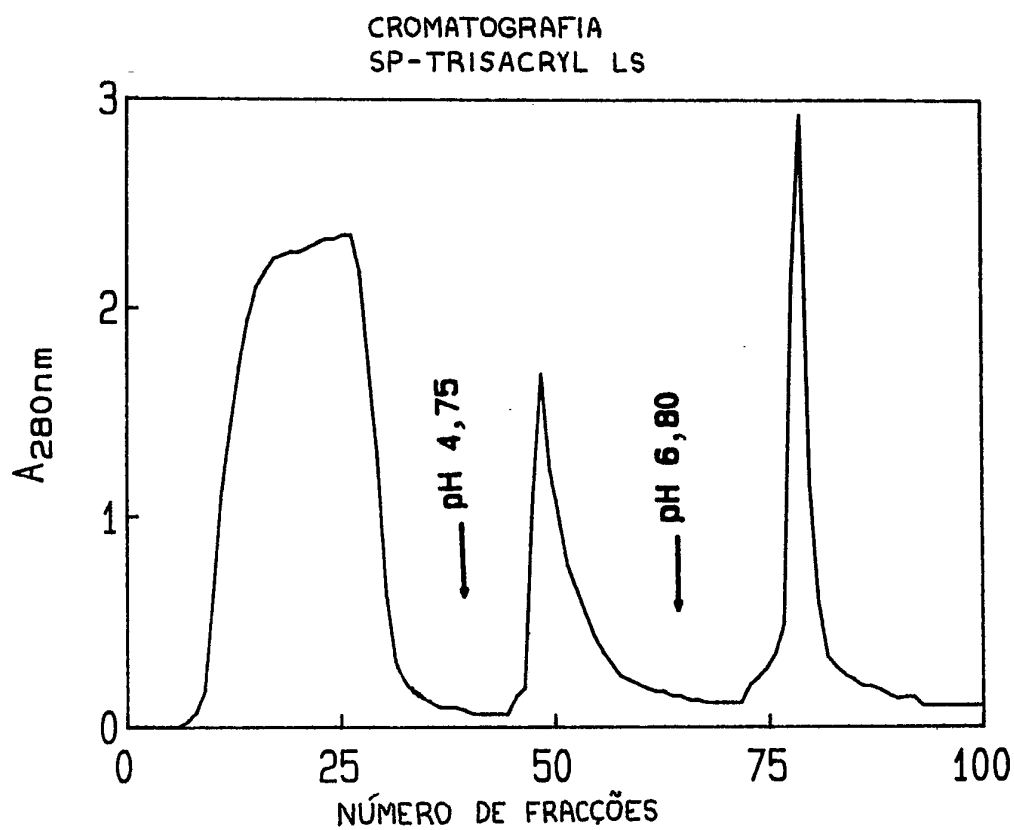
GEL IEF, pI 3-9 DE FRACÇÕES DE UMA COLUNA DE LIPASE MY
SP-TRISACRYL LS



1 2 3 4 5 6 7 8

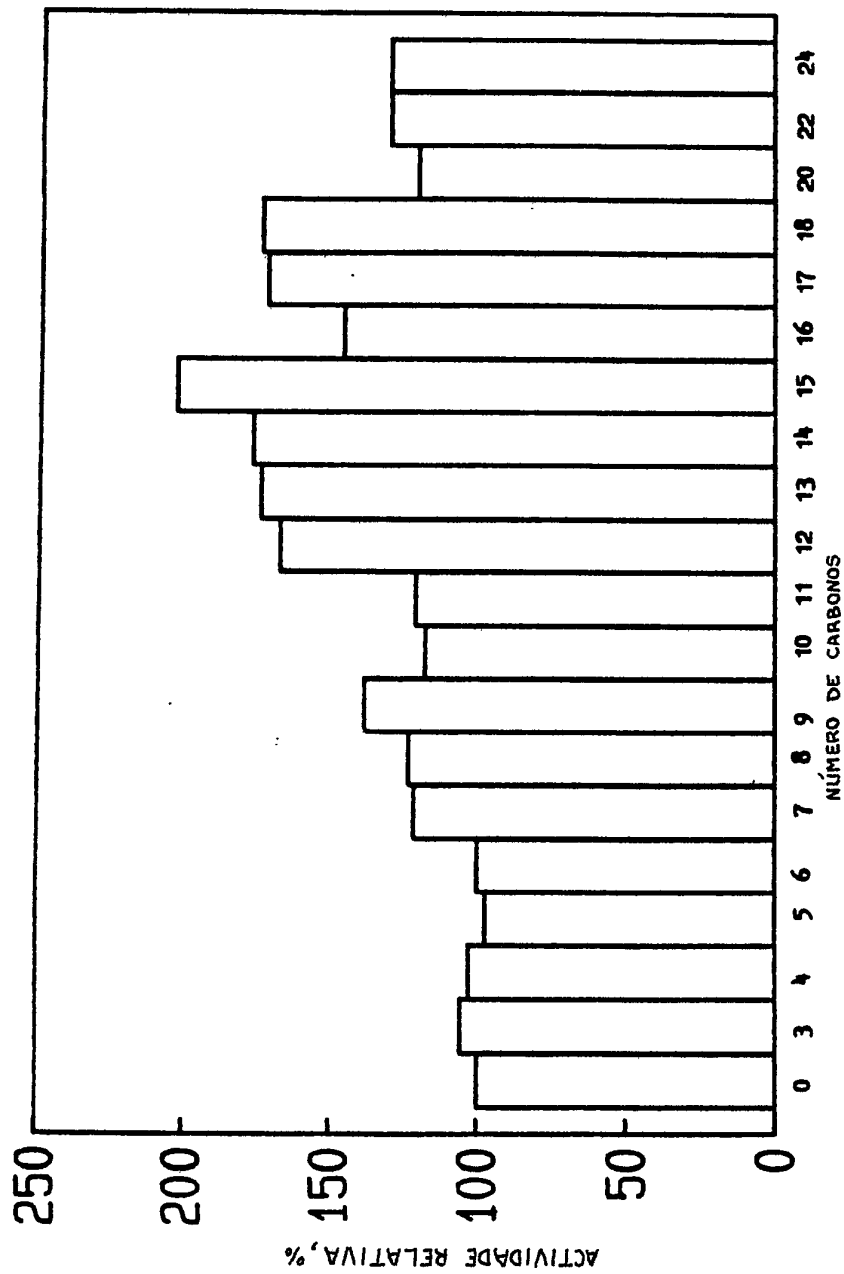
FIG. 7

CROMATOGRAFIA SP-TRISACRYL LS DE LIPASE MY



F I G. 8

EFEITO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE MY



[Handwritten signature]

FIG. 9

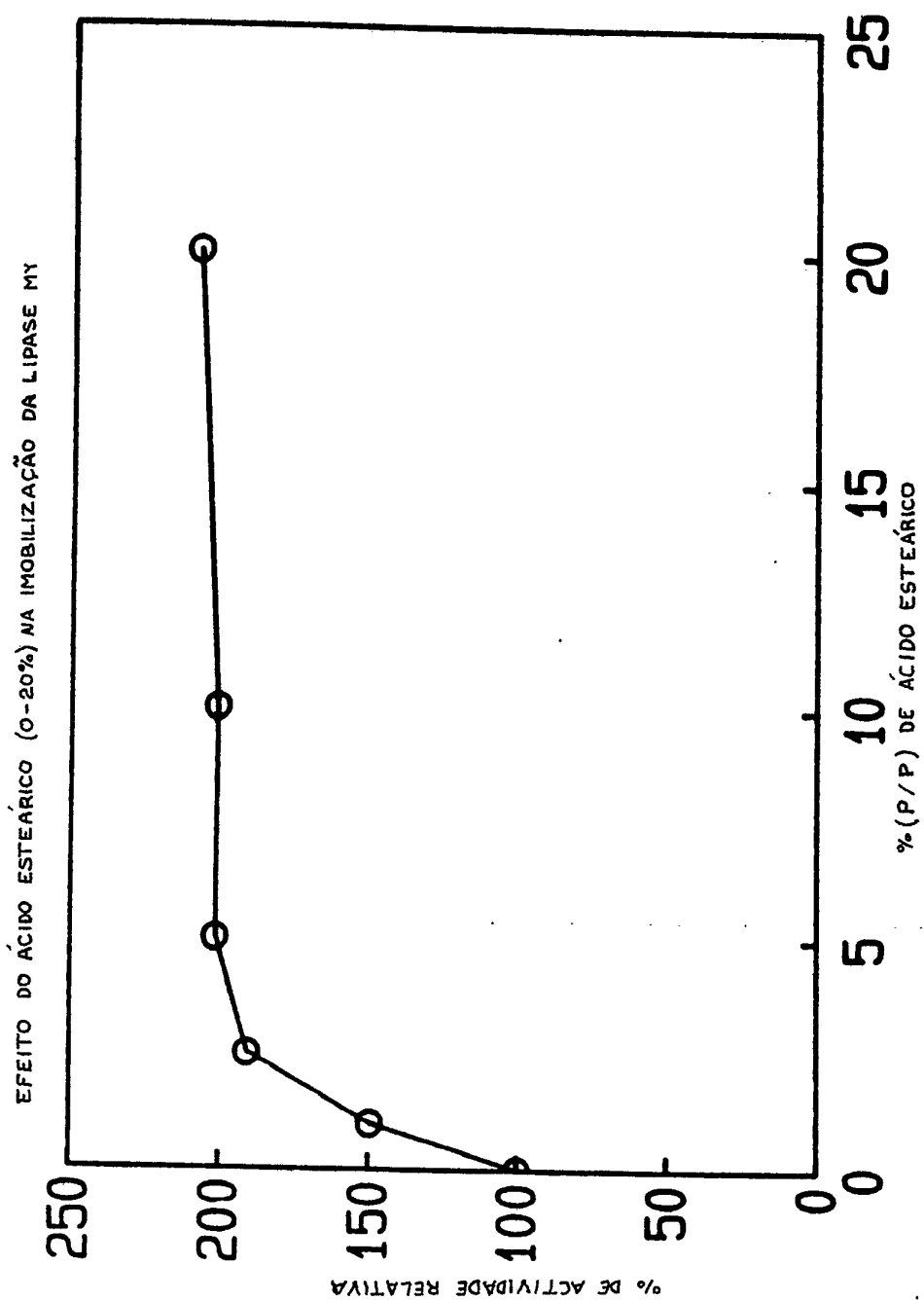
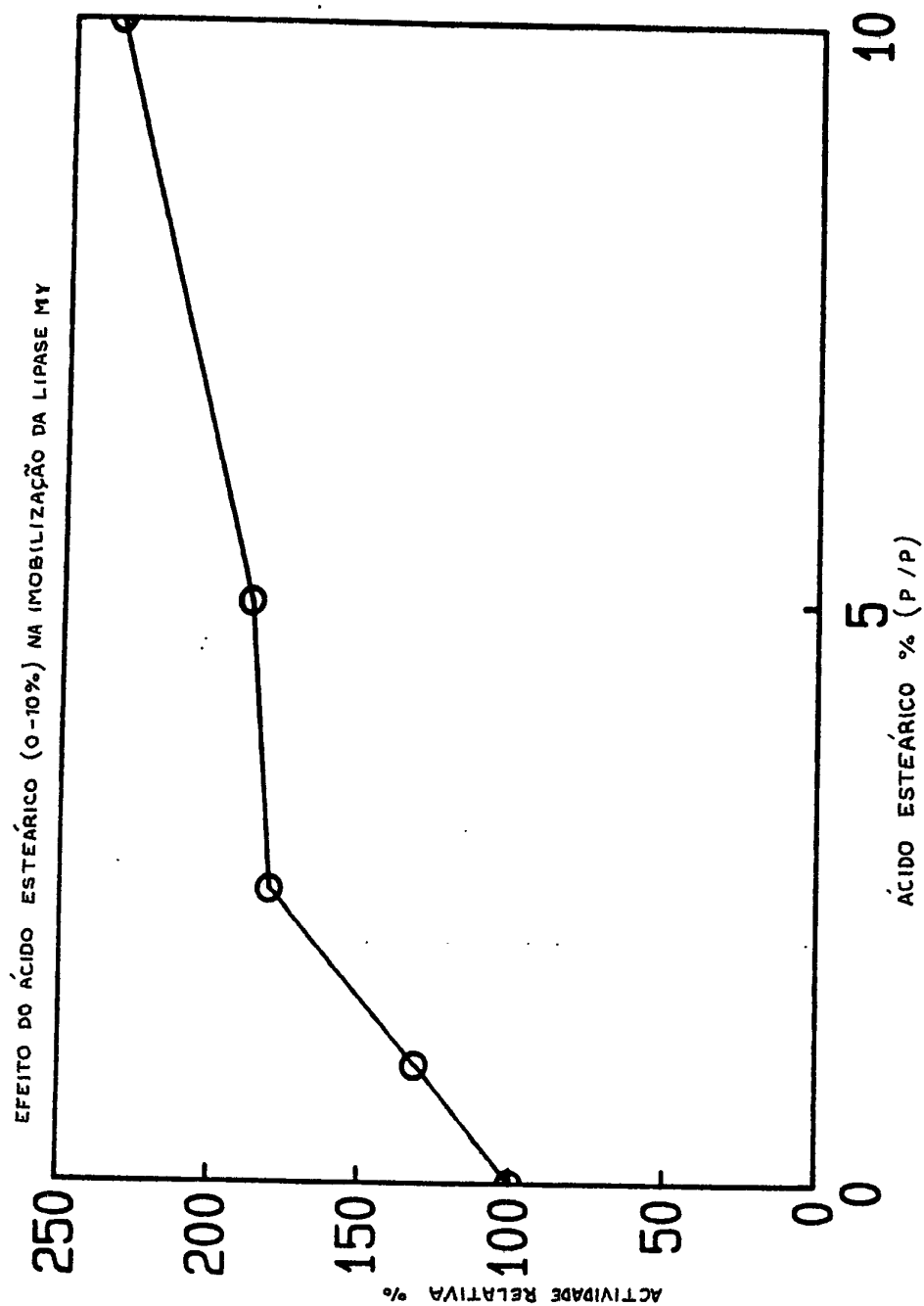
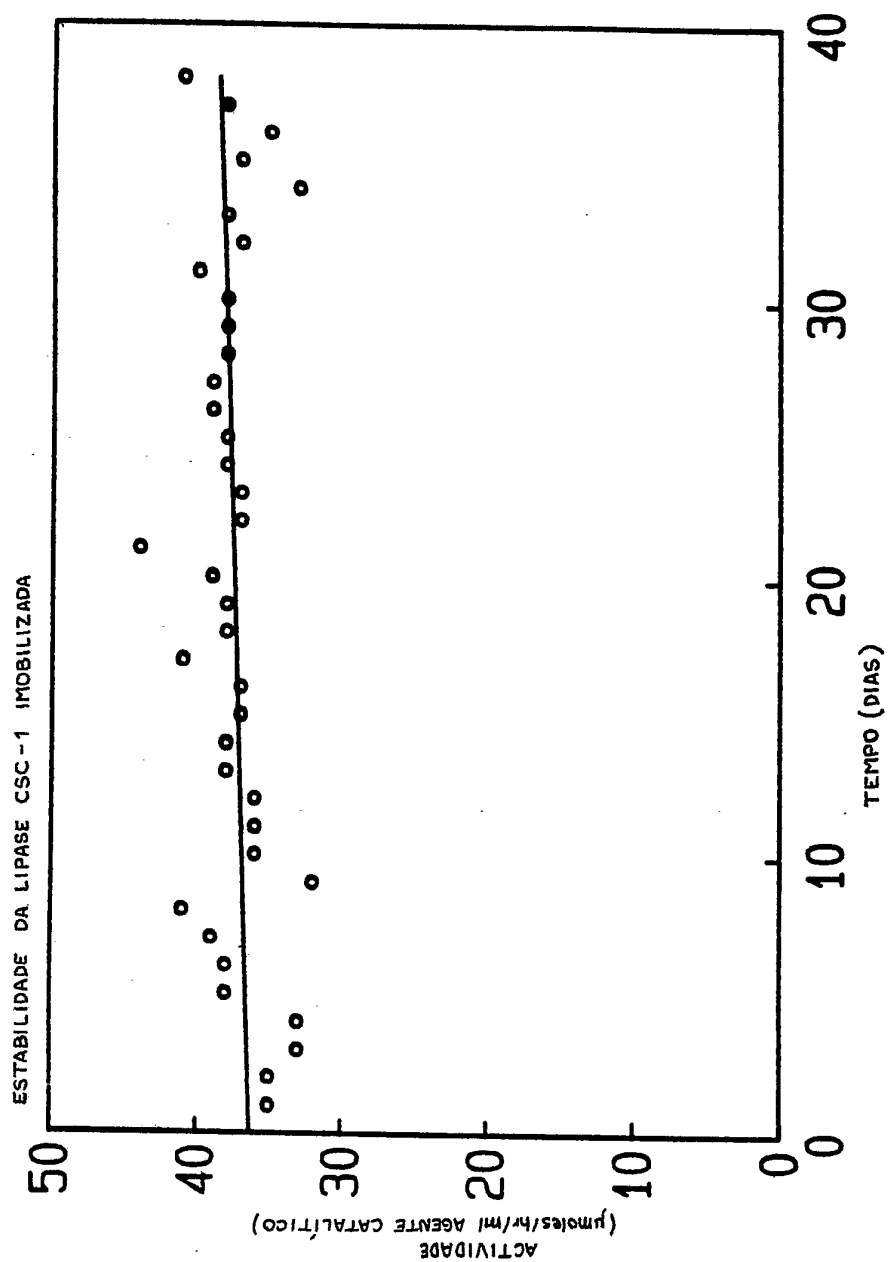


FIG. 10



5

FIG. 11



4.

FIG. 12

SDS-PAGE DE LIPASES DE C. RUGOSA CSC-2 E ENZECO Rxx.
SDS-PAGE 8-15% GEL

60K →

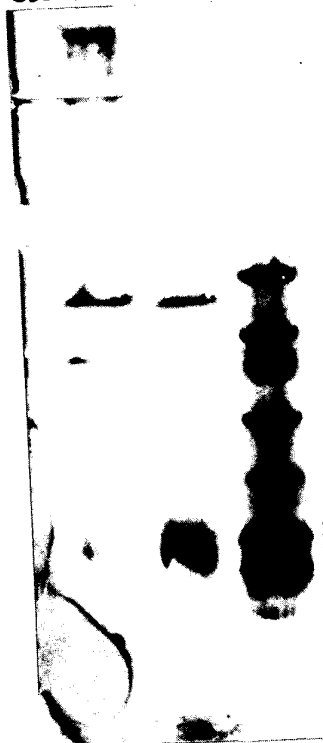
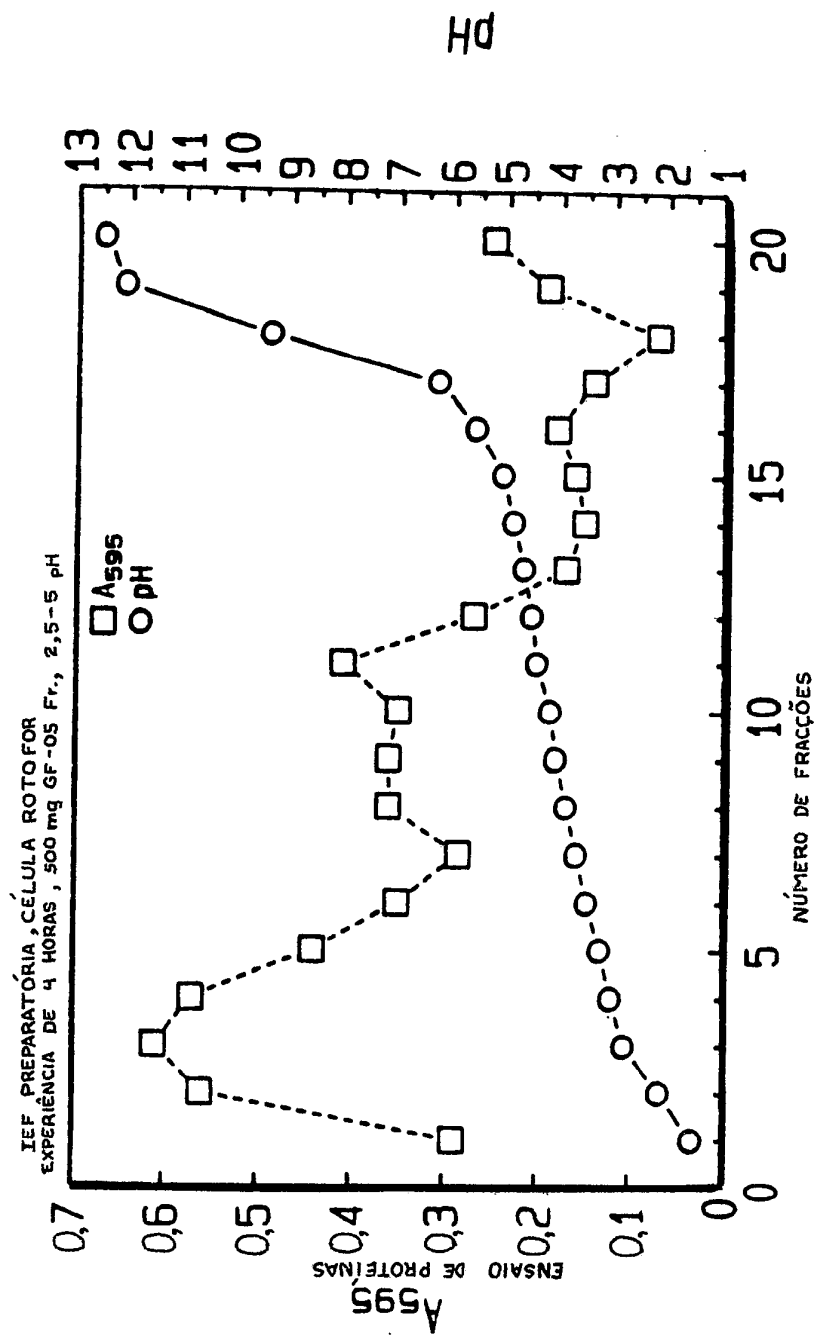
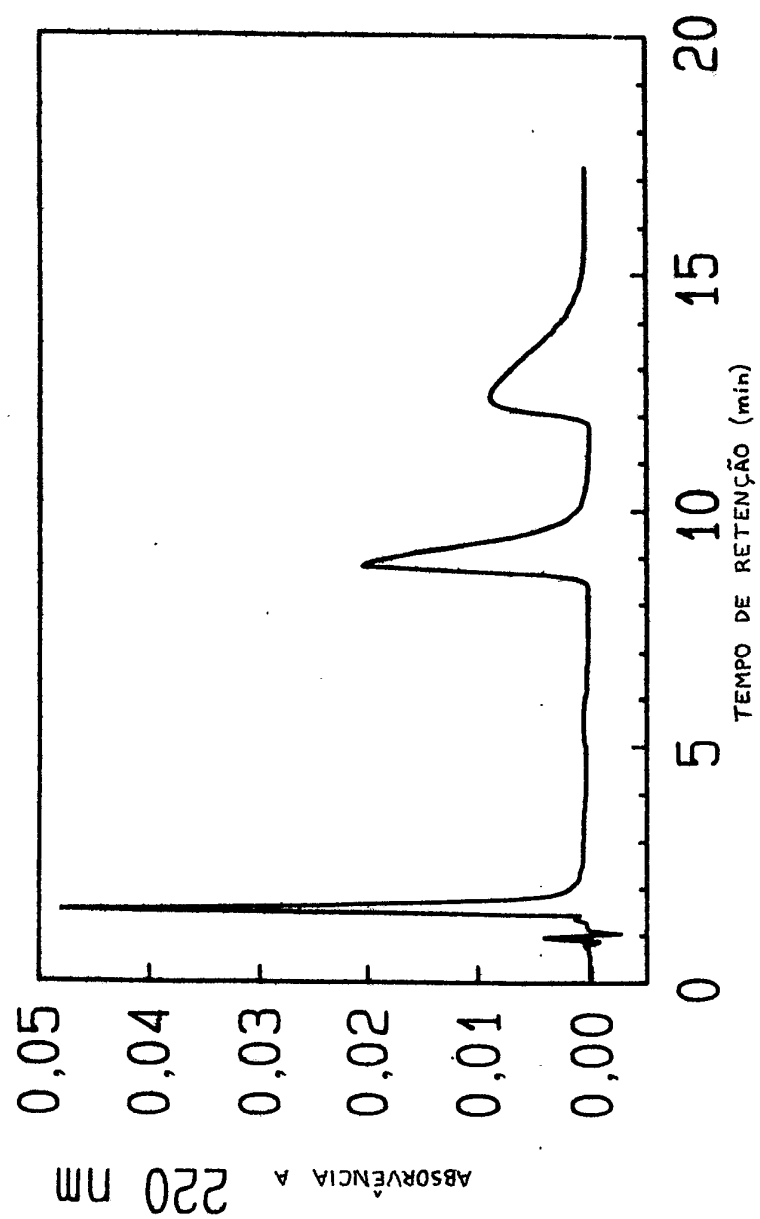


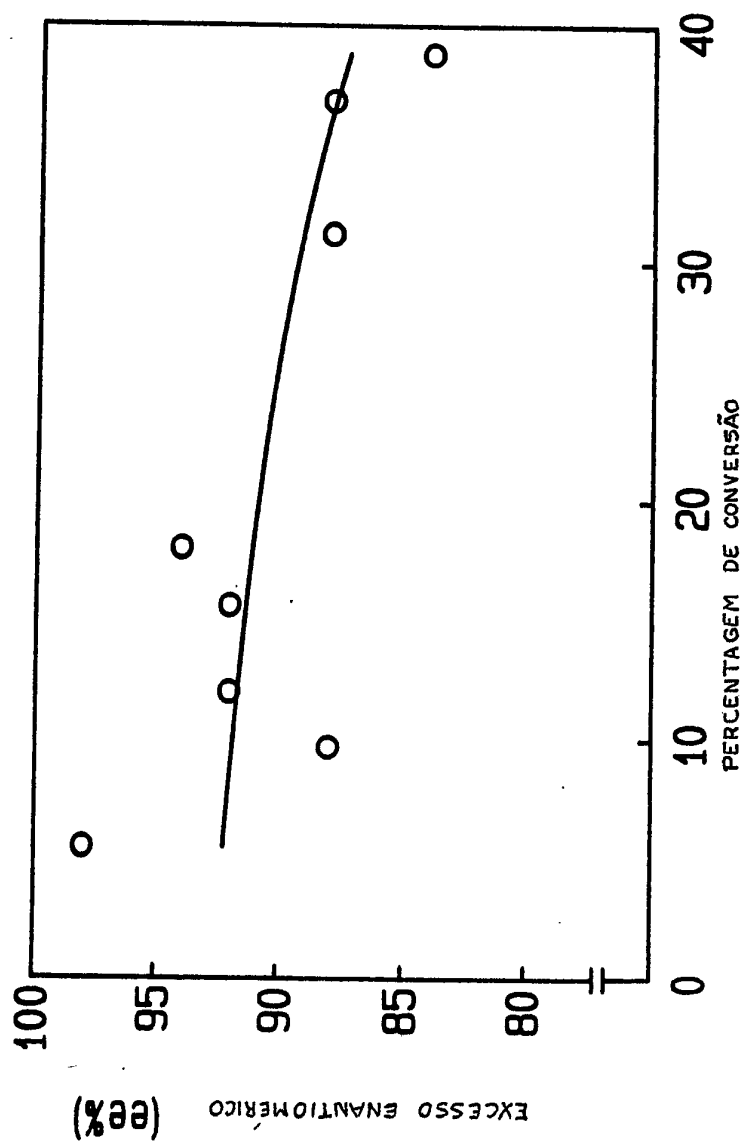
FIG. 13



F I G. 14

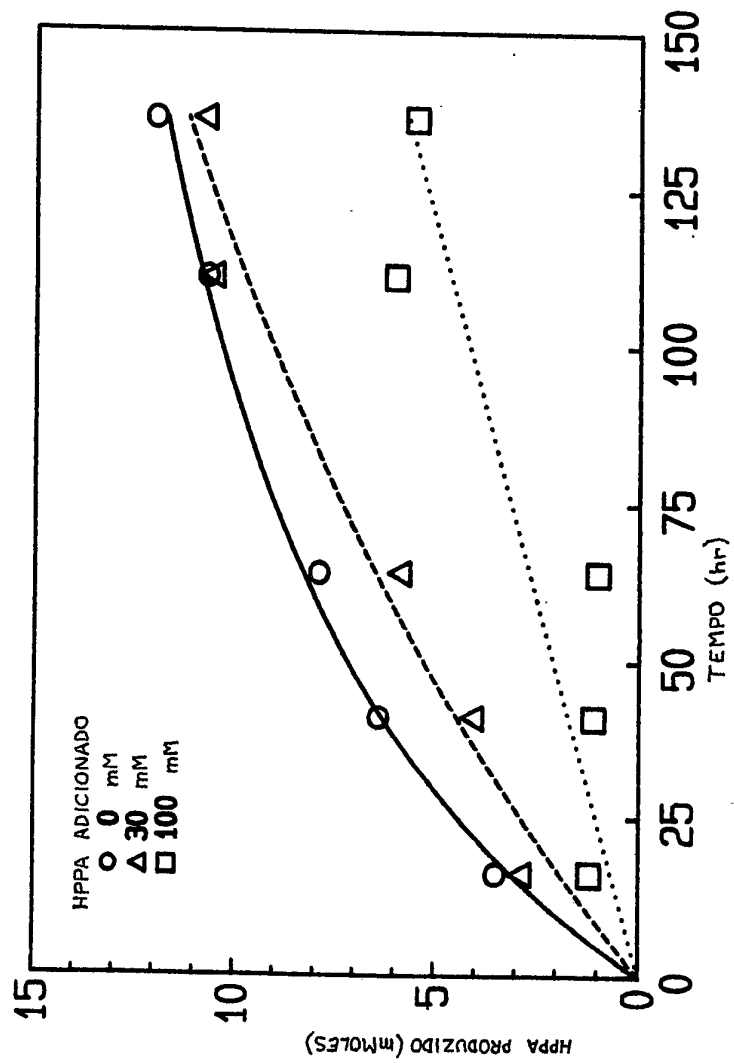


F 1 G. 15



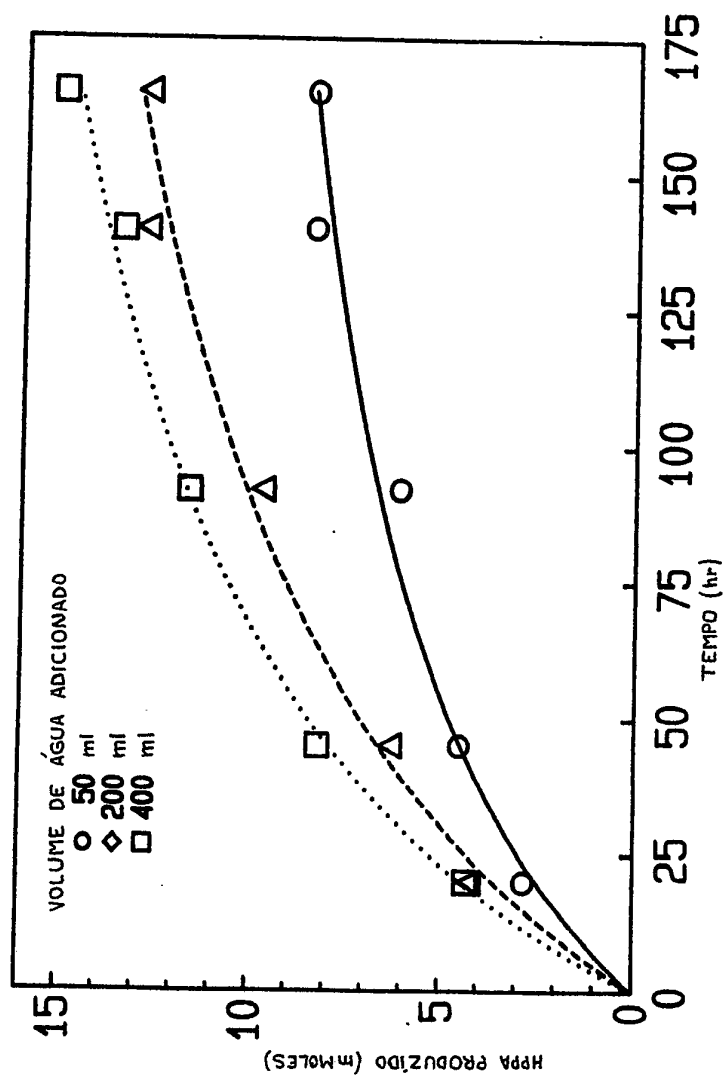
5

FIG. 16



3.

FIG. 17



2

FIG. 18

