



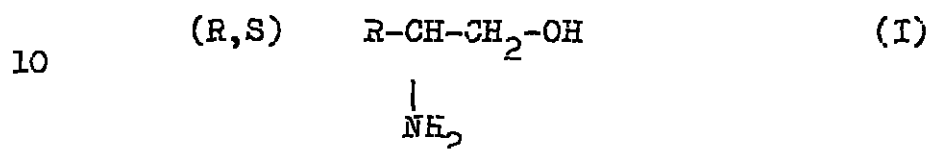
19

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
Ministério da Indústria e do Comércio  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

<b>(12) PEDIDO DE PRIVILÉGIO</b>	<b>A</b>	<b>(11) (21) Número: PI 8701422</b>
		<b>(22) Data do depósito: 27.03.87</b>
<b>(30) Prioridade unionista:</b>		<b>(51) Int. Cl.</b>  C 12 P 41/00
<b>(32) Data</b> <b>(33) País</b> <b>(31) Número</b> 28.03.86      IT      19944 A/86		
<b>(43) Data da publicação do pedido:</b> (RPI ) 05.01.88 (RPI 898)		<b>(54) Título:</b> Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-2mino-1-alcanóis racêmicos
<b>(46) Data da Publicação das reivindicações</b>		
<b>(71) Depositante:</b> Montedson S.p.A. (IT)		<b>(80) Pedido Depositado via PCT - Referências:</b>
<b>(72) Inventor(es):</b> Marco Foa', Franco Francalanci, Pietro Cesti e Tiziano Martinengo		<b>(85) Data do início da fase nacional:</b>
<b>(74) Procurador:</b> Clarke Modet do Brasil Ltda. Av. Presidente Vargas, 542-12º and. RJ.		<b>(86) Pedido internacional</b> Número:      Idioma:      Data:
		<b>(87) Publicação Internacional:</b> Número:      Idioma:      Data:
		<b>(81) Países designados:</b>
		<b>(82) Países eleitos:</b> Comunicado pela RPI nº      de
<b>(23) Complementação da Garantia de Prioridade</b> Data.		<b>(62) Desdobramento (origem)</b> Nº      Data:
<b>(57) Resumo:</b>		

Relatório Descritivo da Patente de Invenção de "PROCESSO PARA SEPARAÇÃO BIOTECNOLÓGICA, EFETUADA POR MEIO DE ENZIMAS, DE ISÔMEROS ÓPTICOS (R) e (S) DE 2-AMINO-1-ALCANOIS RACÊMICOS".

5 A presente invenção refere-se a um processo para a separação por modo enzimático dos isômeros ópticos dos 2-amino-1-alcanois racêmicos da fórmula (I):



na qual R representa um grupo de alquila  $\text{C}_1-\text{C}_3$ .

Os compostos obtidos opticamente ativos de 2-amino-1-alcanol representam uma classe importante de intermediários que podem ser usados utilmente na síntese de produtos ativos biologicamente. Por exemplo: em particular, 2-amino-1-butanol em sua forma S (+) é um intermediário útil para a síntese de um agente antitubercular importante: (+) 2,2'-(etilendiilino) 20 -bis-[1-butanol], (ETHAMBUTOL).

São conhecidos alguns processos para a separação dos antípodas ópticos de (S,R) 2-amino-1-butanol racêmicos através da formação de sais diaste-

reoisoméricos por meio de ácidos ativos opticamente (Patente US 3.944.608; EP. 36.265; Hung Teljes 19.369).

Os processos conhecidos para a resolução dos dois isômeros ópticos, entretanto, são complicados, necessitam reactantes ativos opticamente que são caros, exigem um controle cuidadoso das condições de reação e envolvem várias etapas de cristalização dos produtos, portanto, eles provam ser desvantajosos do ponto de vista industrial.

Recentemente um processo biológico foi descrito (Japanese KOKAI TOKKIO KOHC JP-39-294) capaz de decompor o composto de (R,S) N-acetila-2-amino-1-butanol em seus isômeros ópticos. Tal processo, entretanto, não parece assegurar vantagens suficientes, especialmente do ponto de vista industrial, devido a operações complicadas e dispendiosas de acilação regio-seletiva que devem ser conduzidas no 2-amino-1-butanol racêmico e de separação quantitativa dos produtos.

Portanto, foi sentida a necessidade de ter um processo a disposição, que poderia ser executado industrialmente e poderia permitir a decomposição dos isômeros ópticos de dois 2-amino-1-alcanóis da fórmula (I) conforme definido anteriormente, de acordo com um processo de operação simples, eficaz e econômico.

Portanto, o objetivo da presente invenção é propiciar um processo para execução da separação

ou decomposição dos isômeros óticos dos 2-amino-1-alcanóis racêmicos (I), de acordo com um processo simples, que, em particular, é livre de obstáculos que podem ser encontrados na técnica anterior.

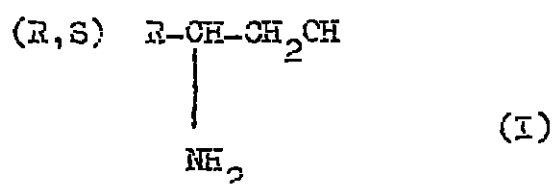
5 Foi observado recentemente que este objetivo pode ser alcançado de acordo com um processo biotecnológico de hidrólise assimétrica enzimática, e executado pelo uso de enzima particulares providas com atividade seletiva, em ésteres racêmicos adequados de  
10 derivados (2,3) II-alcoox-carbonila de 2-amino-1-alcanóis (I) racêmicos, da fórmula (II) conforme definido daqui em diante.

Na prática, é feito uso de enzimas, preferivelmente pertencentes a classe de lipase, ca-  
15 pa de originar a reação da hidrólise, agindo somente sobre a forma (R) dos ésteres racêmicos (II) de um modo estereoseletivo (hidrólise assimétrica). Em seguida, o éster não-reagido (II) em sua forma (S) e na forma (R), que foi hidrolizado e convertido, isto é, se-  
20 letivamente no álcool (R) correspondente da fórmula (III) conforme definido daqui em diante, que são ambos obtidos ao final da hidrólise enzimática, são separados e hidrolizados individualmente, de acordo com os processos e condições usuais, deste modo obtendo os  
25 compostos correspondentes de (R) e (S) 2-amino-1-alcanóis separadamente, na sua forma pura opticamente.

Portanto, o objetivo da presente in-

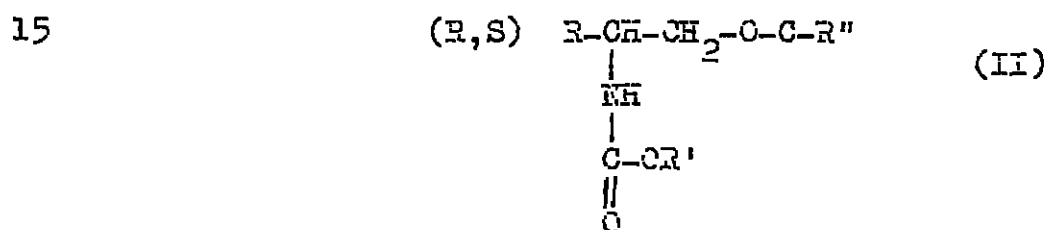
venção, definido de um modo mais explícito, consiste em um processo para a separação biotecnológica, executado por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanóis racêmicos da fórmula (I):

5



10 cujo processo é compreendido pelo fato de que um derivado de éster de (R,S) N-alcoxicarbonila racêmico dos ditos 2-amino-1-alcanóis (I) racêmicos, da fórmula (II):

0

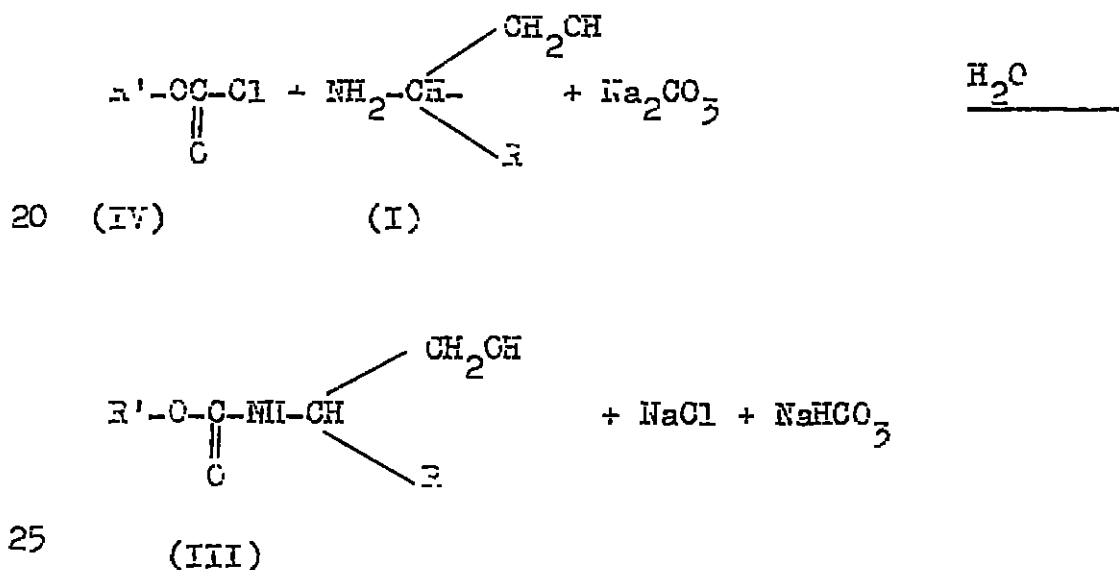


20 na qual o R' representa um grupo de alquila C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> com um grupo de benzila e R e R'', que podem ser os mesmos ou diferentes, representam os grupos de alquila C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, é reagido com uma enzima, capaz de hidrolizar assimetricamente e de um modo predominante, a forma (R) do  
25 éster racêmico contendo a fórmula (II), e visto que, em seguida, pela operação substancial de acordo com as técnicas usuais, obteve álcool (R), correspondendo

38701422

substancialmente a forma (R) do éster racênico hidro-  
 lizado (II), é separado do éster não reagido (II), subs-  
 tancialmente em sua forma (S), que ambos são hidroli-  
 zados separadamente para propiciar compostos (I) de 2-  
 5 amino-1-alcanol (R) e (S) que são opticamente puros.

Os compostos iniciantes, isto é, os  
 ésteres racêmicos da fórmula (II) são compostos conhe-  
 cidos e/ou podem ser sintetizados de acordo com técni-  
 cas usuais, sob condições de reação de Schotten-Bau-  
 10 mann (vide. por exemplo, Jerry March, Advanced Org.  
 Chem.: Reactions Mechanisms and Structure, Mac Grawhill  
 E., págs. 382, 2a. edição, 1977). Na prática, o proces-  
 so consiste a) na reação dos 2-amino-1-alcanóis racêmi-  
 cos da fórmula (I) com alquila-clorofornatos da fórmu-  
 15 la (IV), em um meio aquoso alcalino, de acordo com o  
 seguinte esquema de reação:

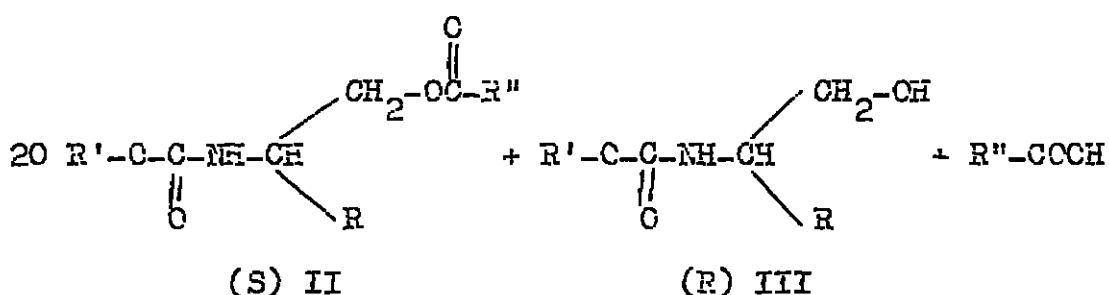
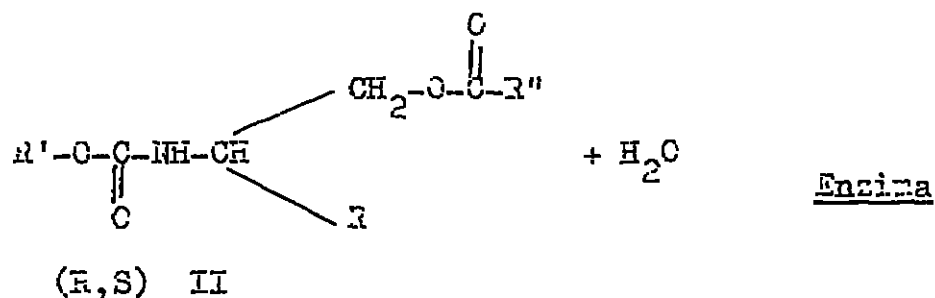


na qual os símbolos R e R' possuem o significado confor

2870142

me definido aqui anteriormente e b) em seguida na esterificação do grupo alcóolico primário com um ácido orgânico R"-COOH, na qual R" possui o significado acima citado, de acordo com as técnicas usuais.

5 De acordo com uma descrição esquemática do processo objetivo da presente invenção, os ésteres racêmicos da fórmula (II) são reagidos com uma enzima, preferivelmente com um lipase, em uma solução aquosa, de acordo com a reação:



na qual os símbolos  $\bar{R}$ ,  $R'$  têm o significado, conforme de  
25 finido aqui anteriormente.

De acordo com a invenção, um lipase po  
de ser usado como enzima, preferivelmente ele é selecio

nado entre a pancreatina e a esteapsina. Tal lipase, ou enzimas pode ser encontrado no mercado a preço baixo e posicionalmente pode ser usado como imobilizado em substratos inertes de natureza diferente.

5 Na reação é feito uso de razões em peso de enzima: o éster racêmico da fórmula (II) variando entre cerca de 1:1 e 1:200, preferivelmente entre 1:20 e 1:100.

A reação de hidrólise dos ésteres racêmicos (II) é efetuada pela agitação forte da mistura consistindo de éster racêmico da fórmula (II) com a enzima, preferivelmente lipase, em um solvente aquoso, a uma temperatura variando entre cerca de 5°C e 60°C, preferivelmente entre 20°C e 40°C, mantendo o 15 valor pH da mistura da reação entre cerca de 5 e 9, preferivelmente entre 6 e 8.

O pH do meio de reação é mantido constante pelo uso de uma solução tampão potássica ou sódica ou pela neutralização da acidez em formação por 20 meio de uma base, tal como KCH, NaCH, etc.

A concentração do éster racêmico iniciante (II) na mistura da reação pode variar entre cerca de 0,1 e 1 mol/litro, de acordo com as características do substrato.

25 O tempo de reação da hidrólise assimétrica pode variar entre 2 e 40 horas, de acordo com os parâmetros de trabalho selecionados.



Quando a reação da hidrólise assimétrica (estereoseletiva) estiver terminada, começa-se a separação dos produtos formados; por exemplo, o álcool da fórmula (III), substancialmente rico na forma (R) e o éster não reagido da fórmula (II), rico em isômero (S) podem ser extraídos da mistura de reação usando-se solventes imiscíveis com água, tal como o cloreto de metileno, clorofórmio, éter, etc. Então os compostos (III) e (S) (II) são separados de acordo com técnicas usuais tais como, por exemplo, cromatografia de coluna, destilação fracional etc.

Alternativamente e de um modo mais vantajoso, os dois produtos podem ser separados pela exploração de sua solubilidade diferente na água pelo uso de solventes orgânicos adequados imiscíveis com  $H_2O$  tal como o benzeno, tolueno, hexano, etc.; técnicas usuais são envolvidas.

Em seguida, no segundo estágio do processo, objetivo da presente invenção, a) éster (S)H-alcoxicarbila derivados de 2-amino-1-alcanol(I), da fórmula (II), que não tem relação substancialmente com a reação da hidrólise enzimática assimétrica que, ao contrário, ocorreu no isômero ótico (R) (II) e b) álcool (R), correspondendo ao último, da fórmula (III), após terem sido separados conforme mencionado anteriormente, são então hidrolizados individualmente, de acordo com técnicas conhecidas, tais como, por exemplo,

38701422

hidrólise alcalina etc., de modo a obter produtos de hidrólise respectivos consistindo de 2-amino-1-alcanóis da fórmula (I), em suas formas correspondentes(R) e (S), que, finalmente são recuperadas, por exemplo, 5 por destilação, etc., do meio aquoso, em seu estado opticamente puro.

Os seguintes exemplos, serão dados para fins de ilustração mas não de limitação da invenção.

10 As seguintes abreviações foram usadas:

L.I.P.U = atividade lipolítica expressada em unidades L.I.P. por mg.

EtCH = álcool etílico

15 e.e. = excesso enantiomérico

A identidade de todos os produtos das fórmulas (I), (II), e (III) foi confirmada pelas análises N.M.R. a 300 MHz.

Os excessos enantioméricos relativos 20 aos isômeros de 2-amino-1-alcanóis da fórmula (I) foram determinados por medidas polariméticas comparadas com os dados de literatura.

#### EXEMPLO 1

##### a) Preparação dos ésteres racêmicos

25 da fórmula (II):

Uma mistura contendo 8,9 g de 2-amino-1-butanol (R,S) e 10,8 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em 40 ml de  $\text{H}_2\text{O}$

foi tratada em 0°C com 10,8 g de cloroformato de etila. O total foi mantido sob agitação em temperatura ambiente por duas horas, então o produto foi extraído com clorofórmio e a solução foi seca em cloreto de cálcio.

5                   Após a evaporação do solvente obteve-se 14,8 g de (R,S) 2-amino-N-etoxicarbonila-1-butanol (produção 92%) que poderia ser purificado novamente em pressão reduzida (b.p. 105-107°C a 0,5 mm Hg)  $\int$  IR,  $\delta$  = 5,2 (d. 1 H); 4,1 (q. 2H); 3,4-3,7 (m. 4 H); 1,35-1,65  
10 (m. 2H); 1,25 (t. 3 H); 0,95 (t. 3H) - em  $CDCl_3$ ].

14 g de tal produto foram dissolvidos em 40 ml de clorofórmio e 8,4 ml de piridina. 6,3 ml de cloreto de acetila foram pingados por 30 minutos na solução, resfriada a 0°C. O total foi mantido sob agita-  
15 ção em temperatura ambiente por 40 minutos e a mistura, assim obtida, foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (50 ml), em seguida com uma solução aquosa de 5% HCl (50 ml) e com  $H_2O$  até que a neutralidade foi atingida. 17 g de acetato de 2-amino-N-e  
20 toxicarbonila-1-butanol racêmico foram obtidas pela evaporação do solvente.

A análise N.M.R. (em  $CDCl_3$ ) proporcionou:

N.M.R.,  $\delta$  = 5,0 (d. 1H); 4,0-4,2 (m. 4H); 3,8 (m. 1H);  
25                   2,1 (s. 3H); 1,4-1,6 (m. 2H); 1,2 (t. 3H);  
0,9 (t. 3H).

Começando dos outros 2-amino-1-alca-

nóis racêmicos correspondentes da fórmula (I), os clo  
roformatos de alquila da fórmula (IV) e os cloretos  
dos ácidos  $R''\text{-COOH}$ , e pela operação sob as mesmas con  
dições, os outros ésteres racêmicos da fórmula (II) fo  
5 ram obtidos, conforme indicado na Tabela 1.

b) Seperação Enzimática dos isômeros  
ópticos dos ésteres racêmicos da fórmula (II)

42 g de acetato de 2-amino-N-etoxicar  
bonila-1-butanol racêmico obtidas no estágio a) foram  
10 adicionadas a 300 ml de uma solução tampão consistin-  
do de uma solução de fosfato de sódio e potássio 0,1N  
a pH 7, contendo 1 g de pancreatina (produzido pela fir  
ma UNIBIOS em Treacate (Itália), contendo 57 F.I.P.U/  
mg).

15 Então a mistura foi mantida sob agi-  
tação a  $20^{\circ}\text{C}$  por 18 horas, mantendo o pH no valor 7  
pela adição do NaOH aquoso 7N. Então a mistura foi ex  
traída com tolueno (300 ml x 3).

17 g de acetato de S (-) 2-amino-N-e  
20 toxicarboneila-1-butanol foram obtidas pela evapora-  
ção do solvente.

17 g de tal produto foram tratadas com  
150 ml de 50% de NaOH aquoso por 3 horas a  $60^{\circ}\text{C}$ . En-  
tão a solução aquosa foi destilada, deste modo recu-  
25 perando 6,9 g de S(+)2-amino-1-butanol contendo:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$   
= + 12,4° (C=2, EtOH, e.e = 99,2%.

Então a fase aquosa oriunda da hidro-

lise enzimática foi extraída novamente com  $\text{CHCl}_3$  (300 mlX3).

Pela evaporação do solvente orgânico, 16 g de (R+) 2-amino-*N*-etoxycarbonila-1-butanol (III) 5 foram obtidas.

16 g de tal produto foram tratadas com 70 cm<sup>3</sup> de 30% de NaOH aquoso, por 3 horas a 60°C. Então a solução aquosa foi destilada, deste modo recuperando 8,9 g de R(-) 2-amino-1-butanol,  $[\alpha]_D^{20} = -9,4^\circ$ , 10 (C=2,25CH); e.e. = 75'.

#### EXEMPLOS 2-7

Pelo uso de outros ésteres racêmicos da fórmula (II), preparados começando dos 2-amino-1-alcanóis racêmicos correspondentes da fórmula (I), os 15 cloroformatos de alquila da fórmula (IV) e dos ácidos da fórmula  $\text{R}''\text{-COOH}$  e pela operação sob as mesmas condições conforme descrito no exemplo 1 a) e 1 b), os 2-amino-1-alcanóis opticamente puros foram obtidos, conforme indicado na Tabela 1.

20 Nos exemplos 2, 5 e 7 como lipase, no lugar da pancreatina, foi feito uso de esteapsina produzida pela firma Sigma Chem, Co. St. Louis, USA, contendo um teor de proteína de 35% e uma atividade igual a 50-70 unidades por mg de proteína.

5

10

15

20

25

T A B E L A 1

Exemplo	R	R'	R''	g. de éster	g. de enzima
Nº	Racênico (II)				
2	$C_2H_5$	$C_2H_5$	$CH_3$	58	Esteapsina 1,4
3	$C_2H_5$	$C_2H_5$	$CH_2CH_2CH_3$	56	Pancreatina 1,2
4	$C_2H_5$	$nC_4H_9$	$CH_3$	60	Pancreatina 1,2
5	$C_2H_5$	$C_6H_5CH_2$	$CH_3$	70	Esteapsina 1,0
6	$CH_3$	$C_2H_5$	$CH_3$	48	Pancreatina 0,6
7	$CH_3$	$C_2H_5$	$CH_3$	48	Esteapsina 1,3

1 1 1  
1 1 1  
1 1 1

38701500

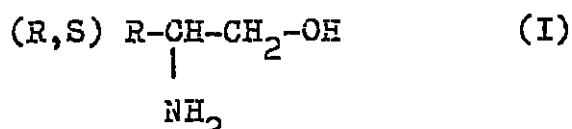
38701422

25 20 15 10 5  
T A B E L A 1 - Continuação

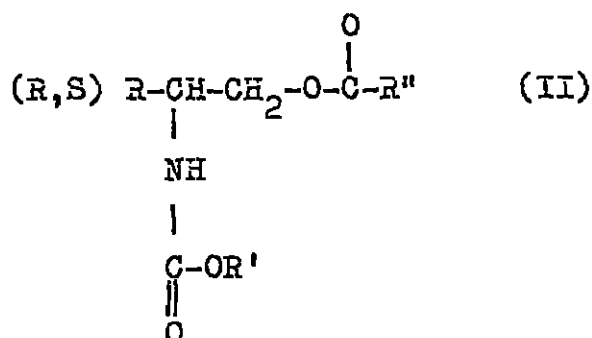
Exemplo	tempo	(S) 2-amino-l-alcanol (I)	(R) 2-amino-l-alcanol (I)	
Nº	(h)	$[\alpha]_D^{20}$ e.e. %	$[\alpha]_D^{20}$ e.e. %	
2	20	10,9 + 12,3°	10,4 -12,4°	99,2
3	4	10,3 + 11,2°	8,4 -12,4°	99,2
4	27	10,1 + 12,3°	10,4 -11,8°	94,4
5	48	7,1 + 12,4°	13,6 -9,1°	72,8
6	20	8,0 + 22,2°	8,6 -21,9°	95,2
7	14	9,0 + 20,2°	7,9 -22,4°	97,4

# REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanóis racêmicos, da  
5 formula (I):



o processo sendo caracterizado pelo fato de que um éster N-alcoxicarbonila racêmico (R,S) derivado dos di-  
10 tos 2-amino-1-alcanóis (I), da fórmula (II):



15

na qual R' representa um grupo de alquila C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> ou um grupo de benzila e R e R'', que podem ser os mesmos ou diferentes, representam grupos de alquila C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, é  
20 reagido com uma enzima, capaz de hidrolizar assimetricamente e de um modo predominante, a forma (R) do éster racêmico da fórmula (II) e pelo fato de que, a-



pós, pela operação substancial de acordo com técnicas conhecidas, obteve-se álcool (R), substancialmente correspondendo a forma (R) do éster racêmico hidrolizado (II) é separado do éster não reagido (II), substancialmente em sua forma (S), e então tanto o (álcool (R) e o éster não reagido (II) em sua forma (S)) são hidrolizados separadamente para propiciar os compostos (R) e (S) 2-amino-1-alcanóis, que são puros opticamente.

2 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanóis racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a enzima consiste de um lipase selecionado do grupo compreendendo a pancreatina e a esteapsina.

3 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanóis racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é feito uso de razões em peso de enzima: éster racêmico da fórmula (II), variando entre 1:1 e 1:200.

4 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanóis racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é feito uso de razões em peso de enzima: éster racêmico da fórmula (II), variando entre cerca de 1:20 e 1:100.

5 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanois racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação da hidrólise assimétrica enzimática é efetuada a uma temperatura variando entre cerca de 5°C e 60°C.

6 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanois racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação da hidrólise assimétrica enzimática é efetuada a uma temperatura variando entre cerca de 20°C e 40°C.

7 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanois racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação da hidrólise assimétrica enzimática é efetuada em um valor pH variando entre cerca de 5 e 9, pelo uso de uma solução tampão básica ou uma base mineral.

8 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanois racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é feito uso de uma enzima conforme imobilizado

em um substrato.

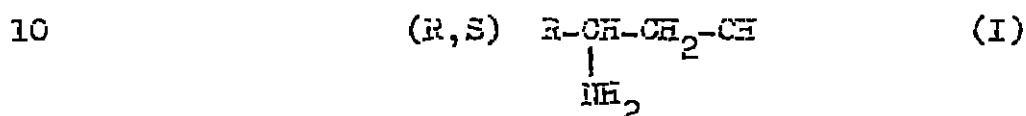
9 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanois racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração do éster racêmico (II) na mistura da hidrólise assimétrica enzimática varia entre cerca de 9,1 e 1 mol/litro da mistura.

10 - Processo para separação biotecnológica, efetuada por meio de enzimas, de isômeros ópticos (R) e (S) de 2-amino-1-alcanois racêmicos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o éster (S) N-alcoxicarbonila derivado de 2-amino-1-alcanol (I), da fórmula (II) e o álcool (R) produzidos por hidrólise enzimática são separados e hidrolizados separadamente por hidrólise alcalina.

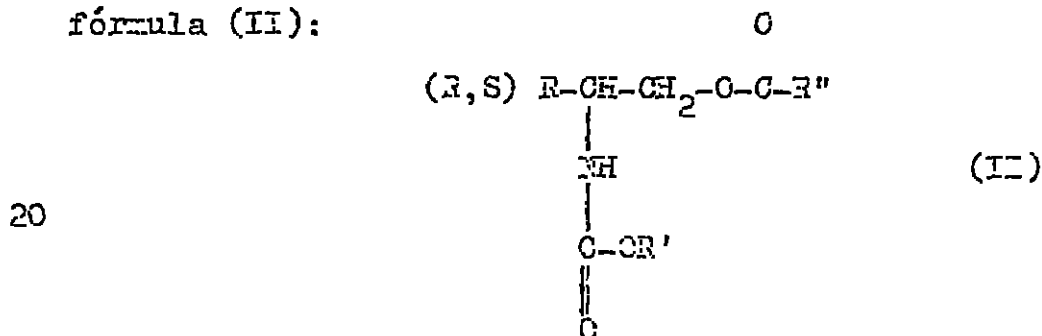
RESUMO DA INVENÇÃO

Patente de Invenção de "PROCESSO PARA  
SEPARAÇÃO BIOTECNOLÓGICA, EFETUADA POR MEIO DE ENZIMAS  
DE ISÔMEROS ÓPTICOS (R) E (S) DE 2-AMINO-1-ALCANÓIS RA  
5 CÊMICOS".

Trata-se da descrição de um processo  
para a resolução enzimática de 2-amino-1-alcânóois ra-  
cêmicos da fórmula (I):



onde R representa um grupo de alquila  $C_1-C_3$ , cujo pro-  
cesso consiste da hidrólise enzimática assimétrica dos  
15 ésteres (R,S) N-alcóxicarbonila racêmicos derivados  
dos 2-amino-1-alcânóois racêmicos acima citados (I), da  
fórmula (II):



na qual o R" possui o mesmo significado do R, e o R' representa um grupo de alquila C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ou um grupo de benzila, na presença de uma enzima, preferivelmente um lipase, capaz de hidrolizar seletivamente (assimétricamente) o isômero (R) do ester (II), deixando o isômero (S) inalterado, em seguida procede a separação usual e a hidrólise dos produtos da hidrólise enzimática nos 2-amino-1-alcancóis (R) e (S) separados da fórmula (I).

10 Os compostos opticamente obtidos ativos de 2-amino-1-alcanol podem ser usados como intermediários para a produção de produtos ativos biologicamente.