

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Hidrólise Enantiosseletiva de $\alpha$ e $\beta$ -Butiriloxifosfonatos Mediadas por Lipase de *Candida rugosa*

Lucidio C. Fardelone<sup>1</sup>, J. Augusto A. R. Rodrigues<sup>1</sup> e Paulo J. S. Moran<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química  
Caixa Postal 6154 – 13083-970, Campinas – SP - E-mail: lucidio.fardelone@iqm.unicamp.br

#### RESUMO

As hidrólises enantiosseletivas dos  $\alpha$ - e  $\beta$ -butiriloxifosfonatos ( $\pm$ )-**2a-e** mediadas por lipase de *Candida rugosa* forneceram rendimentos químicos superiores a 46,8% e excessos enantioméricos de 96,4 a >99%, demonstrando a importância da metodologia para a obtenção de  $\alpha$  e  $\beta$ -hydroxyphosphonatos quirais.

Palavras-chave: *Candida rugosa*, hidrólise enzimática, síntese assimétrica,  $\alpha$ -hidroxifosfonatos,  $\beta$ -hidroxifosfonatos.

#### INTRODUÇÃO

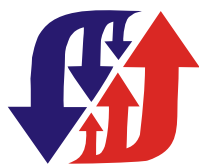
Os compostos  $\alpha$  e  $\beta$ -hidroxifosfonatos são de extrema importância devido ao potencial de atividade biológica, como inibidores de renina, 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase - EPSP sintase, HIV protease, além de serem intermediários quirais em síntese de produtos de química fina, farmacêutica e agroquímica (Zou et al. 2015; Sobhani e Tashrifi 2010).

Na literatura estão descritas biotransformações de compostos organofosforados, as quais utilizam células íntegras de *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium sp.*, *Geotrichum candidum* e *Rodothorula glutinis*, bem como o uso de resolução enzimática com lipases de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Mucor michei*, entre outras, para a obtenção de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -hidroxifosfonatos opticamente ativos (Żymaniak-Duda et al. 2011; Yamagishi et al. 2004; Zhang et al. 2003; Yuan et al. 2001). No entanto, a redução enantiosseletiva de cetofosfonatos, bem como a resolução de  $\alpha$ - e  $\beta$ -hidroxifosfonatos (Brzezińska-Rodak et al. 2011; Kafarski e Lejczak 2004) por células íntegras e enzimas apresentam dificuldades de síntese, pois a seletividade depende da natureza dos grupos substituintes e da posição do grupo carbonila ou hidroxila, além de certos compostos cetofosfonatos serem degradados em meio aquoso, diminuindo o rendimento e o excesso enantiomérico (ee).

Neste trabalho relatamos importantes resultados obtidos na síntese de  $\alpha$ - e  $\beta$ -hidroxifosfonatos mediadas pela enzima lipase de *Candida rugosa*, com rendimentos químicos, superiores a 78%, quando considerado 30% de conversão e rendimento máximo de 50% para a obtenção dos  $\alpha$  e  $\beta$ -hidroxifosfonatos com ee 96,4 a >99%.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Os compostos cloroacetona, 2-cloro-1-feniletanona, benzaldeído, 2-clorobenzaldeído, cinamalaldeído, anidrido butírico, dimetilaminopiridina e ácido oxálico foram adquiridos da



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Sigma-Aldrich Co e a lipase de *Candida rugosa* foi cedida pela Amano Enzyme Inc. - Japão. Os demais solventes e reagentes são comerciais.

Os compostos  $\beta$ -hidroxifosfonatos ( $\pm$ )-**1a** e ( $\pm$ )-**1b** foram sintetizados a partir de cloroacetona e 2-cloro-1-feniletanona, respectivamente, em reação com iodeto de potássio em acetonitrila e trimetilfosfíto, à temperatura ambiente, conforme descrito por Pietruszka e Wittinstitut (2006), seguido de redução com borihidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), fornecendo rendimentos isolados superiores a 88% após purificação em sistema de cromatografia Biotage, utilizando acetona como eluente. Os  $\alpha$ -hidroxifosfonatos ( $\pm$ )-**1c-e** foram sintetizados, com pequenas mudanças para otimização, segundo a metodologia de Vahdat et al. (2008) a partir de 2-clorobenzaldeído, benzaldeído e cinamaldeído reagindo com 1,1 equivalente de trimetilfosfíto, na ausência de solvente e à temperatura de 80 °C, fornecendo os  $\alpha$ -hidroxifosfonatos ( $\pm$ )-**1c-e** com rendimento superior a 94%. Os  $\alpha$ -hidroxifosfonatos ( $\pm$ )-**1a-e** foram esterificados utilizando anidrido butírico e 0,5 mol% de dimetilaminopiridina - DMAP, como catalizador, em diclorometano à temperatura ambiente, fornecendo os compostos ( $\pm$ )-**2a-e** com rendimento superiores a 85% após purificação em sistema de cromatografia Biotage, utilizando gradiente acetona/metanol. As estruturas químicas dos compostos sintetizados foram confirmadas por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$  e análise de CGEM e estão de acordo com a literatura (Sun et al. 2013; Zhang et al. 2003 e 2002; Spilling e Rowe 2001).

As hidrólises enantiosseletivas de  $\alpha$ - e  $\beta$ -butiriloxifosfonatos ( $\pm$ )-**2a-e** utilizando lipase de *Candida rugosa* foram realizadas em sistema bifásico, com éter diisopropílico e tampão fosfato 0,1 M pH 7 contendo 1,2 M de  $\text{MgCl}_2$ , à temperatura de 40 °C, por 4-24 h, com excelentes rendimentos químicos de 78-92%, considerando a conversão obtida de 30% nas reações de hidrólise, após purificação em sistema de cromatografia Isolera One da Biotage, utilizando gradiente de hexano-acetona como fase móvel. As configurações absolutas foram determinadas através da comparação das medidas de rotação óptica ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ ) dos compostos obtidos (*R*)-**1a-e** e (*S*)-**2a-e** com as descritas na literatura (Sun et al. 2013; Zhang et al. 2003 e 2002; Spilling e Rowe 2001).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A hidrólise enantiosseletiva de  $\alpha$ - e  $\beta$ -butiriloxifosfonatos ( $\pm$ )-**2a-e** mediada por lipase de *Candida rugosa* forneceram os  $\beta$ -hidroxifosfonatos (*R*)-(+)-**1a-b** e  $\alpha$ -hidroxifosfonatos (*R*)-(+)-**2c-e** e estão representados na Figura 1.

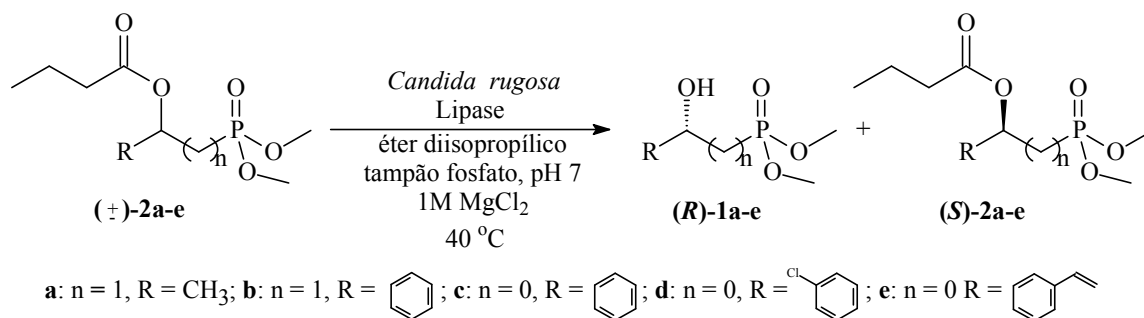
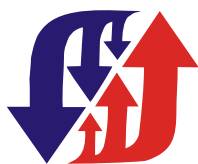


Figura 1 - Hidrólise enantiosseletiva de  $\alpha$ - e  $\beta$ -butiriloxifosfonatos ( $\pm$ )-**2a-e**.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Na Tabela 1, estão reportados os rendimentos químicos, isolados, e os excessos enantioméricos dos compostos  $\alpha$ -  $\beta$ -hidroxifosfonatos (*R*)-**1a-e** obtidos das reações de hidrólise enantiosseletiva de  $\alpha$ - e  $\beta$ -butiriloxifosfonatos ( $\pm$ )-**2a-e** mediadas por lipase de *Candida rugosa*.

Tabela 1 - Hidrólise enantiosseletiva de  $\alpha$ - e  $\beta$ -butiriloxifosfonatos ( $\pm$ )-**2a-e** mediada por lipase de *Candida rugosa*.<sup>a</sup>

Substrato	Produto	Tempo (h)	Rendimento isolado (%) <sup>b</sup>	$[\alpha]_D^{25}$	ee (%)	E (%)
<b>2a</b>	( <i>R</i> )- <b>1a</b>	24	46,8	+14	97,8	135
<b>2b</b>	( <i>R</i> )- <b>1b</b>	12	50,4	+28	98,5	>200
<b>2c</b>	( <i>R</i> )- <b>1c</b>	24	52,8	+39,1	>99	>200
<b>2d</b>	( <i>R</i> )- <b>1d</b>	24	51,2	+28,8	96,4	81
<b>2e</b>	( <i>R</i> )- <b>1e</b>	4	55,2	+38,3	>99	>200

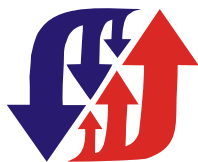
<sup>a</sup> 1 mmol de substrato foi dissolvido em 2 mL de éter diisopropílico e adicionados a uma suspensão de 80 mg de lipase de *Candida rugosa* em 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7, e 240 mg de MgCl<sub>2</sub>, mantendo a mistura reacional sob agitação magnética e à temperatura de 40 °C. As reações foram monitoradas por CGMS até conversão de 30%.<sup>b</sup> Rendimento isolado (%) calculado em relação a 50% de resolução enzimática.

As reações de hidrólise enantiosseletivas foram conduzidas em sistema bifásico utilizando éter diisopropílico e tampão fosfato 0,1 M, pH 7, com adição de 1.2 M de MgCl<sub>2</sub>, que tem a função de diminuir a agregação da enzima no sistema bifásico, proporcionando uma melhor performance do processo biocatalítico (Zhang et al. 2003; Okamoto 2000; Kvittingen et al. 1992). Desta maneira, as reações de hidrólise enantiosseletiva forneceram rendimentos químicos, isolados, superiores a 46,8%, ee 96,4 a >99% e valores de Enantiosseletividade (E) superiores a 81%, o que demonstra que o processo é uma excelente metodologia de síntese para a produção de  $\alpha$ - e  $\beta$ -hidroxifosfonatos opticamente ativos. As configurações absolutas foram determinadas através da comparação das medidas de rotação óptica ( $[\alpha]_D^{25}$ ) com as descritas na literatura (Sun et al. 2013; Zhang et al. 2003), e os valores E (%) foram calculados de acordo com Yuan et al. (2003) e Spilling e Rowe (2001).

Estudos complementares para maior compreensão do processo biocatalítico serão realizados para otimização do processo de obtenção dos  $\alpha$ - e  $\beta$ -hidroxifosfonatos opticamente ativos, bem como aumento do número de compostos com diferentes substituintes e serão reportados futuramente. É importante ressaltar que estes compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ -hidroxifosfonatos opticamente ativos podem ser utilizados em rotas sintéticas para a produção de intermediários para as indústrias de química fina, agroquímica e farmacêutica.

### CONCLUSÕES

Os resultados obtidos das reações de hidrólise enantiosseletivas de  $\alpha$ - e  $\beta$ -butiriloxifosfonatos ( $\pm$ )-**2a-e** mediadas por lipase de *Candida rugosa* demonstraram que a metodologia empregada para obtenção de (*R*)-(+)-**1a-e** e de (*S*)-(-)-**1a-e** é de extrema importância, pois forneceram rendimentos químicos superiores a 46,8% e ee 96,4 a  $\geq$  99%.



# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a cessão da lipase *Candida rugosa* pela empresa Amano Enzyme Inc. e ao suporte financeiro da CAPES, FAPESP (2014/00108-9) e CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brzezińska-Rodak M, Klimek-Ochab M, Żymańczyk-Duda E, Kafarski P. 2011. Biocatalytic resolution of enantiomeric mixtures of 1-aminoethanephosphonic acid. *Molecules* 16:5896-5904.
- Kafarski P, Lejczak B. 2004. Application of bacteria and fungi as biocatalysts for the preparation of optically active hydroxy phosphonates. *J Mol Catal B: Enzym* 29:99-104.
- Kvittingen L, Sjursnes B, Anthonsen, T, Hailing, P. 1992. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron* 48:2793-2802.
- Okamoto T, Ueji S. 2000. A new method for improving the enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis in organic solvent containing a small amount of water in the presence of metal ions. *Biotechnol Lett* 22:1169-1171.
- Pietruszka J, Wittinstitut A. 2006. Synthesis of the Bestmann-Ohira reagent. *Synthesis* 24:4266-4268.
- Rowe BJ, Spilling CD. 2001. The synthesis of 1-hydroxy phosphonates of high enantiomeric excess using sequential asymmetric reactions: titanium alkoxide-catalyzed P-C bond formation and kinetic resolution. *Tetrahedron Asymmetry* 12:1701-1708.
- Sobhani S, Tashrifi Z. 2010. Synthesis of  $\alpha$ -functionalized phosphonates from  $\alpha$ -hydroxy phosphonates. *Tetrahedron* 66:1429-1439.
- Sun L, Guo Q-P, Li X, Zhang L, Li Y-Y, Da C-S. 2013. C<sub>2</sub>-Symmetric homobimetallic zinc complexes as chiral catalysts for the highly Enantioselective hydrophosphonylation of aldehydes. *Asian J Org Chem* 2:1031-1035.
- Vahdat SM, Baharfar R, Tajbakhsh M, Heydari A, Bagbanian SM, Khaksar S. 2008. Organocatalytic synthesis of  $\alpha$ -hydroxy and  $\alpha$ -aminophosphonates. *Tetrahedron Lett* 49:6501-6504.
- Yamagishi T., Miyame T., Yokomatsu T., Shibuya S. 2004. Lipase-catalyzed kinetic resolution of  $\alpha$ -hydroxy-H-phosphinates. *Tetrahedron Lett* 45:6713-6716.
- Yuan, C-Y, Wang K, Li Z-Y. 2001. Enantioselective reduction of 2-keto-3-haloalkane phosphonates by baker's yeast. *Heteroatom Chem* 12:551-556.
- Zhang Y-H, Xu C-F, Li J-F, Yuan C-Y. 2003. *Candida rugosa* lipase-catalyzed kinetic resolution of hydroxyalkanephosphonates. *Chin J Chem* 21:883-892.
- Zhang Y, Yuan C, Li Z. 2002. Kinetic resolution of hydroxyalkanephosphonates catalyzed by *Candia antarctica* lipase B in organic media. *Tetrahedron* 58:2973-2978.
- Zou J, Li D, Liu K, Zhou S. 2015. Preparation method of beta-hydroxyphosphonate derivatives. Soochow University - Chine, patent CN104370960.
- Żymańczyk-Duda E, Brzezińska-Rodak M, Klimek-Ochab M, Lejczak B. 2011. Application of the *Beauveria bassiana* strain for the enantioselective oxidation of the diethyl 1-hydroxy-1- phenylmethanephosphonate. *Curr Microbiol* 62:1168-1172.