

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS α -HIDROXIFOSFONATOS OPTICAMENTE ATIVOS UTILIZANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS DE MICRORGANISMOS

L. M. SATO¹, T. N. KITAMURA¹, L. C. FARDELONE², J. A. R. RODRIGUES²
e P. J. S. MORAN²

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

² Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química

E-mail para contato: moran@iqm.unicamp.br

RESUMO – As reduções enantiosseletivas dos cetofosfonatos **1a-c** por *Lactobacillus brevis* CCT 3745 forneceram (*S*)-(-)-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (**S**)-(-)-**2a**, (*S*)-(-)-((4-metoxifenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (**S**)-(-)-**2b**, (*S*)-(-)-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (**S**)-(-)-**2c** e com o uso de *Candida albicans* CCT 5847 forneceram (*R*)-(+)-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (**R**)-(+)-**2a**, (*R*)-(+)-((4-metoxifenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (**R**)-(+)-**2b** e (*R*)-(+)-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (**R**)-(+)-**2c** com rendimentos entre 78-90%. Os (*S*)-(-)- e (*R*)-(+)- α -hidroxifosfonatos **2a-c** são importantes intermediários para síntese de produtos de química fina, agroquímicos e fármacos.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos α -hidroxifosfonatos opticamente ativos (quirais) são compostos importantes dentro da classe de organofosforados devido as suas propriedades biológicas (DEMME *et al.*, 2011) e também por serem intermediários em química fina, farmacêutica e agrícola, principalmente como inibidores enzimáticos (GREMBECKA *et al.*, 2003), antibióticos (DAKE *et al.*, 2011), agentes antivirais (MOORE e DREYER, 1993), antitumorais (KRAICHEVA *et al.*, 2009), pesticidas (KAFARSKI e LEJCZAK, 2004), entre outros.

Os compostos organofosforados possuem ligação direta fósforo-carbono (P-C), formando moléculas com centros quirais, cuja configuração espacial específica influencia diretamente na atividade da molécula, pois estes compostos organofosforados são análogos aos aminoácidos.

Na literatura estão descritas várias metodologias para a obtenção de compostos α -hidroxifosfonatos, como o uso de catalisadores organometálicos (LIN *et al.*, 2013), de indutores quirais (OLSZEWSKI, 2015; ALEGRE-REQUENA *et al.*, 2014), uso de enzimas isoladas, mas necessitam de coenzimas, cofatores, que normalmente possuem custos elevados. O processo também necessita de um sistema para reciclagem destes cofatores, para mantê-lo eficiente e economicamente viável (KROUTIL *et al.*, 2004). No entanto a redução enantiosseletiva de cetofosfonatos, bem como a resolução de α -hidroxifosfonatos

(MAJEWSKA *et al.*, 2005) por células íntegras e enzimas tem recebido atenção nos últimos anos, pois estão dentre os métodos de química verde para a obtenção de compostos opticamente ativos (BRZEZIŃSKA-RODAK *et al.*, 2011).

A biocatálise é um dos principais métodos utilizados em síntese enantiosseletiva devido ao uso de enzimas e células íntegras, e estas possuem alta quimio-, regio- e estereosseletividade (CAZETTA *et al.*, 2014; FARDELONE *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2004). Normalmente as condições de reações são brandas, pois utilizam baixas temperaturas ou ambiente e pressão atmosférica, e compostos “não naturais” podem ser aceitos como substratos. Assim, a biocatálise possui vantagens como estratégia de síntese, pois consome menos energia, normalmente não há subprodutos de reação, gera resíduos biodegradáveis e é economicamente viável devido ao menor custo em relação aos complexos metálicos (catalisadores).

Neste trabalho, a preparação de derivados organofosforados com bons rendimentos químicos (78-90%) e a biotransformação destes organofosforados mediada por *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e *Candida albicans* CCT 5847 fornecendo enantiosseletividade na obtenção de α -hidroxifosfonatos opticamente ativos foram reportados.

2. MATERIAIS E MÉTODO

Os compostos 4-clorobenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 3,4-dimetoxibenzaldeído e ácido oxálico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. e os compostos racêmicos (\pm)-((4-clorofenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (\pm)-**2a**, (\pm)-((4-metoxifenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (\pm)-**2b** e (\pm)-((3,4-dimetoxifenil)(hidroxi)metil)fosfonato de dimetila (\pm)-**2c** foram sintetizados de acordo com o método descrito por VAHDAT *et al.* (2008). Já os compostos (4-clorobenzoil)fosfonato de dimetila **1a**, (4-metoxibenzoil)fosfonato de dimetila **1b** e (3,4-dimetoxibenzoil)fosfonato de dimetila **1c** foram sintetizados de acordo com metodologia descrita por MOORE e FINNEY (2002). Os demais solventes e reagentes são comerciais e possuem grau analítico.

2.1. Condições de cultura dos microrganismos

A bactéria *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e a levedura *Candida albicans* CCT 5847 foram adquiridas da Fundação André Tosello, Campinas-SP, e foram cultivadas utilizando meio de cultura contendo 3% m/v de extrato de levedura e 3% m/v de peptona de soja, componentes estes utilizados em produção industrial, e com certificação de isenção de componentes animais, em 100 mL de água, suplementado com 0,2% m/v de glicose. Os microrganismos foram mantidos por 16 horas de incubação à temperatura de 30°C em incubadora refrigerada, 0,54 g, antes do uso. Todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121 °C, por 30 minutos, e os microrganismos foram manipulados em cabine de fluxo laminar. Após o crescimento do microrganismo este foi centrifugado, 1844 g por 30 minutos, resuspenso em 200 mL de água e centrifugado, 1844 g por 30 minutos, e resuspenso em 100 mL de água para o uso nos processos de biorredução.

2.2. Processo para a obtenção dos α -hidroxifosfonatos racêmicos (\pm)-2a-c

Os (\pm)- α -hidroxifosfonatos **2a-c** foram sintetizados por adição equimolar do aldeído correspondente em trietilfosfito, seguido da adição de 0,10 mol% de ácido oxálico, e na ausência de solvente. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e à temperatura de 80 °C por 2 horas. O produto bruto foi extraído com acetato de etila e lavado com bicarbonato de sódio, e em seguida rotaevaporado e purificado através de sistema de cromatografia Isolera One da Biotage utilizando gradiente de solvente hexano/acetona.

2.3. Processo para a obtenção dos cetofosfonatos 1a-c

Os cetofosfonatos **1a-c** foram sintetizados por adição de 6 mmol de IBX em uma solução de 2 mmol de α -hidroxifosfonatos **2a-c** correspondente em 30 mL de acetonitrila anidra. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e à temperatura de 80 °C por 1 hora. O produto bruto foi filtrado e transferido para um funil de separação para extração com acetato de etila, seco com sulfato de sódio anidro, rotaevaporado e purificado através de sistema de cromatografia Isolera One da Biotage utilizando gradiente de solvente hexano/acetona.

2.4. Processo de biorredução dos cetofosfonatos 1a-c

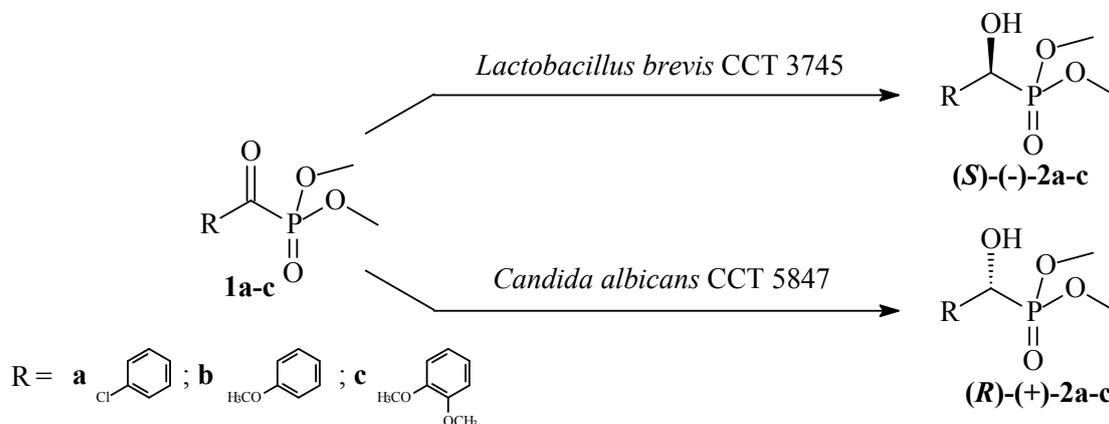
Os cetofosfonatos **1a-c** (0,61 mmol), dissolvidos em 0,5 mL de etanol foram adicionados a uma suspensão de 4 g de células íntegras em 100 mL de água. As suspensões microbianas foram mantidas sob agitação, 0,54 g, e à temperatura de 30 °C em incubadora refrigerada por 18 horas. Os produtos brutos foram extraídos com acetato de etila e purificados através de sistema de cromatografia Isolera One da Biotage utilizando gradiente de solvente hexano/acetona.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os organofosforados **1a-c** foram sintetizados segundo a metodologia de VAHDAT *et al.* (2008) a partir de 4-clorobenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído e 3,4-dimetoxibenzaldeído reagindo com 1,1 equivalente de trimetilfosfito, na ausência de solvente e à temperatura de 60 °C fornecendo os α -hidroxifosfonatos **1a-c** racêmicos, os quais foram oxidados com ácido 2-iodoxibenzóico (IBX) em acetonitrila anidra à temperatura de 80 °C (MOORE e FINNEY, 2002).

A obtenção dos hidroxifosfonatos (*S*)-(-)-**2a-c** e (*R*)-(+)-**2a-c** foi realizada através da reação de biorredução dos cetofosfonatos **1a-c** mediada por células íntegras de *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e *Candida albicans* CCT 5847 respectivamente, e estão representados, de forma esquemática na Figura 1.

Figura 1 – Biorredução de cetofosfonatos **1a-c** por *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e *Candida albicans* CCT 5847.



Na Tabela 1, estão reportados os rendimentos químicos, isolados, e a configuração absoluta dos α -hidroxifosfonatos **2a-c** obtidos através da biorredução dos cetofosfonatos **1a-c** por *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e *Candida albicans* CCT 5847.

Tabela 1 – Biorredução de cetofosfonatos **1a-c** por *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e *Candida albicans* CCT 5847.

Substrato	Produto	Microrganismo	Rendimento isolado (%)	$[\alpha]_D^{25}$
1a	(S)-2a	<i>Lactobacillus brevis</i> CCT 3745	80	- 52
1b	(S)-2b	<i>Lactobacillus brevis</i> CCT 3745	81	- 43
1c	(S)-2c	<i>Lactobacillus brevis</i> CCT 3745	78	- 13
1a	(R)-2a	<i>Candida albicans</i> CCT 5847	82	+ 37
1b	(R)-2b	<i>Candida albicans</i> CCT 5847	90	+ 41
1c	(R)-2c	<i>Candida albicans</i> CCT 5847	84	+ 15

Nota: rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) refere-se ao ângulo do desvio do plano da luz polarizada (BARRON, 2009)

Os rendimentos químicos obtidos foram superiores a 78% para todos os substratos submetidos à biorredução, o que demonstrou que o processo é uma boa metodologia de síntese para a produção de α -hidroxifosfonatos opticamente ativos. As configurações absolutas foram determinadas através da comparação das medidas de rotação óptica ($[\alpha]_D^{25}$) com as descritas na literatura (LIN *et al.*, 2013).

O mecanismo das reações de biorreduções foi efetuado através da transferência de hidreto pela coenzima NADH ou NADPH mediada pela enzima desidrogenase (ALEIXO *et al.*, 1993). É interessante notar que as biorreduções dos substratos **1a-c** são realizadas com bons a excelentes rendimentos dos produtos isolados **2a-c** mesmo tendo grupos substituintes doadores de elétron por ressonância como 4-Cl-, 4-CH₃O- e 3,4-diCH₃O- ligados ao anel aromático. A diminuição da reatividade causada por esses grupos substituintes deve ser contrabalanceada pelo grupo fosfonato ligado diretamente à ligação C=O.

Uma das vantagens de se utilizar os microrganismos *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e *Candida albicans* CCT 5847 é a enantiocomplementariedade na obtenção dos α -hidroxifosfonatos **2a-c**, podendo ser utilizados de acordo com a necessidade de obtenção da configuração desejada, o que demonstra que a metodologia aplicada nas biotransformações é de fundamental importância para serem aplicadas em síntese de compostos opticamente ativos.

É importante ressaltar que estes compostos α -hidroxifosfonatos opticamente ativos podem ser utilizados em rotas sintéticas para a produção de intermediários para as indústrias de química fina, agroquímica e farmacêutica.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos das reduções enantiosseletivas com os microrganismos *Lactobacillus brevis* CCT 3745 e *Candida albicans* CCT 5847 forneceram bons rendimentos isolados (78-90%) e os álcoois (*S*)-(-)- e (*R*)-(+)- α -hidroxifosfonatos **2a-c** podem ser utilizados como intermediários de síntese para produtos de química fina, agroquímicos e fármacos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro à FAPESP (2014/00108-9), a CAPES e ao CNPq.

6. REFERÊNCIAS

- ALEIXO L. M.; CARVALHO, M.; MORAN, P. J. S. AND RODRIGUES, J. A. R.. Hidride transfer versus electron transfer in the Baker's yeast reduction of α -haloacetophenones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 3, p. 1637-1642, 1993.
- ALEGRE-REQUENA, J. V., MARQUÉS-LÓPEZ, E., MIGUEL, P. J. S., HERRERA, R. P.. Organocatalytic enantioselective hydrophosphonylation of aldehydes. *Org. Biomol. Chem.*, v. 12, p. 1258-1264, 2014.
- BARRON, L. D.. Molecular light scattering and optical activity. Cambridge University Press, 2ª edição, 2009.
- BRZEZIŃSKA-RODAK, M., KLIMEK-OCHAB, M.; ŻYMAŃCZYK-DUDA, E.; KAFARSKI, P.. Biocatalytic resolution of enantiomeric mixtures of 1-aminoethanephosphonic acid. *Molecules*, v. 16, p. 5896-5904, 2011.
- CAZETTA, T.; MORAN, P. J. S.; RODRIGUES, J. A. R.. Highly enantioselective deracemization of 1-phenyl-1,2-ethanediol and its derivatives by stereoinversion using *Candida albicans* in a one-pot process. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, v. 109, p. 178-183, 2014.
- DAKE, S. A.; RAUT, D. S.; KHARAT, K.R.; MHASKE, R. S.; DESHMUKH, S. U.; PAWAR, R. P.. Ionic liquid promoted synthesis, antibacterial and in vitro antiproliferative activity of novel α -aminophosphonate derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 21, p. 2527-2532, 2011.

- DEMMER, C. S.; KROGSGAARD-LARSEN, N.; BUNCH, L.. Review on Modern Advances of Chemical Methods for the Introduction of a Phosphonic Acid Group. *Chem. Rev.*, v. 111, p. 7981-8006, 2011.
- FARDELONE, L. C.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S.. Chiral Pharmaceutical Intermediaries Obtained by Reduction of 2-Halo-1-(4-substituted phenyl)-ethanones Mediated by *Geotrichum candidum* CCT 1205 and *Rhodotorula glutinis* CCT 2182. *Enzyme Res.*, 2011:976368, 2011.
- GREMBECKA, J.; MUCHA, A.; CIERPICKI, T.; KAFARSKI, P.. The most potente organophosphorus inhibitors of leucine aminopeptidase. Structure-based design, chemistry, and activity. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 2641-2655, 2003.
- KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B.. Application of bacteria and fungi as biocatalysts for the preparation of optically active hydroxyphosphonates. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 29, p. 99-104, 2004.
- KRAICHEVA, I.; BOGOMILOVA, A.; TSACHEVA, I.; MOMEKOV, G.; TROEV, K.. Synthesis, NMR charaktersation and in vitro antitumor evaluation of new aminophosphonic acid diesters. *Eur. J. Med. Chem.*, p. 44, p. 3363-3367, 2009.
- KROUTIL, W.; MANG, H.; KLAUS, E. FABER, K. KROUTIL, W.; MANG, H.; KLAUS, E. FABER, K.. Recent advances in the biocatalytic reduction and oxidation of sec-alcohol. *Cur. Op. Chem. Biol.*, v. 8, p. 120-126, 2004.
- LIN SUN, L.; GUO, Q.-P.; LI, X.; ZHANG, L.; LI, Y.-Y.; DA, C.-S.. C2-Symmetric homobimetallic zinc complexes as chiral catalysts for the highly enantioselective hydrophosphonylation of aldehydes. *Asian J. Org. Chem.*, v. 2, p. 1031-1035, 2013.
- MAJEWSKA, P.; KAFARSKI, P.; LEJCZAK, B.. Lipase-catalysed resolution of 1-hydroxyethane-P- phenylphosphinates. *Pol. J. Chem.*, v. 79, p. 561-566, 2005.
- MOORE, J. D.; FINNEY, N. S.. A Simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with *o*-iodoxybenzoic acid (IBX). *Org. Lett.*, v. 4, p. 3001-3004, 2002.
- MOORE, M. L.; DREYER, G. B.. Substrate-based inhibitors of HIV-1 protease. *Perspect. Drug Discovery Des.*, v. 1, p. 85-108, 1993.
- OLSZEWSKI, T. K.. Asymmetric synthesis of α -hydroxymethylphosphonates and phosphonic acids via hydrophosphonylation of aldehydes with chiral H-phosphonate. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 26, p 393-399, 2015.
- RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; FARDELONE, L. C.. Recent advances in the biocatalytic asymmetric reductions of acetophenones and α,β -unsaturated carbonyl compounds. *Food. Technol. Biotechnol.*, v. 42, p. 295-303, 2004.
- VAHDAT, S. M.; BAHARFAR, R.; TAJBAKSH, M.; HEYDARI, A.; BAGBANIAN, S. M.; KHAKSAR, S.. Organocatalytic synthesis of α -hydroxy and α -aminophosphonates. *Tetrahedron Lett.*, v. 49, p. 6501-6504, 2008.