



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614045-9 A2**

(22) Data de Depósito: 28/06/2006
(43) Data da Publicação: 09/03/2011
(RPI 2096)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 7/04

(54) Título: **REDUÇÃO ASSIMÉTRICA DE 1,1,1-TRIFLUORACETONA**

(30) Prioridade Unionista: 08/07/2005 EP 05 106261.1

(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

(72) Inventor(es): ERNST KUPFER, STEPHAN DOSWALD,
STEVEN PAUL HANLON

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006063621 de 28/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/006650 de 18/01/2007

(57) Resumo: REDUÇÃO ASSIMÉTRICA DE 1,1,1-TRIFLUORACETONA A presente invenção refere-se a um processo biocatalítico escalonável para a preparação de S-1,1,1-trifluor-2-propanol com um excesso enantiomérico de >99% através da redução microbiana assimétrica de 1,1,1-trifluoracetona com Levedura de padeiro.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**REDUÇÃO ASSIMÉTRICA DE 1,1,1-TRIFLUORACETONA**".

A presente invenção refere-se à preparação de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol enantiomericamente puro (>99% de excesso enantiomérico) com um biocatalisador através de uma redução assimétrica de 1,1,1-trifluoracetona.

O (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol enantiomericamente puro é um constituinte importante para a preparação de ingredientes farmacêuticos ativos isomericamente puros (APIs), usados para o tratamento de distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos. Para a preparação de APIs é absolutamente necessário usar constituintes isomericamente puros e/ou procedimentos altamente estereosseletivos, porque componentes secundários em APIs podem ter efeitos adversos no tratamento de doenças. Deste modo, uma alta pureza é requerida para todos os APIs.

O objetivo da presente invenção é a preparação de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol enantiomericamente puro com um excesso enantiomérico (ee) de >99%, que pode ser usado como um constituinte-chave para a preparação de APIs enantiomericamente puros como, por exemplo, descrito no WO 2005/014563. Como nem a pureza enantiomérica do constituinte (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol nem aquela de seus intermediários subseqüentes na síntese com relação aos respectivos APIs pode ser enriquecida é essencial usar na síntese (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol de >99% ee.

J.W.C. Crawford (1967), J. Chem. Soc. (C) 2332-2333 descrevem um método para produção de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol, onde ácido (±)-1-(trifluormetiletóxi)propiônico (o aduto do álcool e ácido acrílico) foi separado em seus isômeros ópticos através de seu sal de quinina, e (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol puro foi obtido do alcóxi-ácido puro enantiomérico através de hidrólise alcalina e destilação. Embora este método dê (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol de pureza enantiomérica alta (rotação óptica: $-5,65^\circ$), o método não é adequado para produção em grande escala.

T.C. Rosen e outros (2004), Chimica Oggi Suppl., 43-45, prepararam ambos (R)- e (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol através de redução assimétri-

ca de 1,1,1-trifluoracetona usando álcool desidrogenases (ADHs) ou em seus hospedeiros naturais ou como enzimas recombinantes expressas em *E. coli*. Células integrais em descanso ou extratos livres de célula bruta podem ser usados e no último caso adição de um sistema de regeneração de co-fator é necessário. O (S)-1,1,1-trifluor-2-propanol resultante está disponível para compra na Jülich Fine Chemicals, mas o material oferecido é de pureza enantiomérica insuficiente (>92,5% ee) para as necessidades da requerente.

M. Buccierelli e outros (1983), Synthesis 11, 897-899, descrevem a preparação de (S)-1,1,1-trifluor-2-propanol através da redução de 1,1,1-trifluoracetona usando Levedura de padeiro (descanso) em escala de laboratório. Embora a reação prossiga rápido (4 horas), um excesso de levedura de 300 vezes com relação ao substrato é requerido, a concentração do substrato é apenas 2,5 g/kg de suspensão de levedura e (S)-1,1,1-trifluor-2-propanol é obtido apenas com aproximadamente 80% ee (conforme calculado a partir da rotação óptica de $-4,5^\circ$ para o álcool isolado, comparação com $-5,6^\circ$ para o álcool puro), um valor que é muito mais baixo do que as necessidades da requerente. Ainda, o protocolo de isolamento, com base em extração de solvente repetida em combinação com destilação, não é aplicável economicamente em grande escala.

Existem vários métodos usados na literatura para otimizar a estereosseletividade de reduções microbianas, por exemplo, tratamento com acetona das células microbianas ou realização da biotransformação em solventes orgânicos. Ambos métodos têm as desvantagens que uso de solventes torna o processo mais caro e, mais importante, o solvente usado complica mais o procedimento já exigente para o isolamento de (S)-1,1,1-trifluor-2-propano, que possui um ponto de ebulição de $76-77^\circ\text{C}$.

Um outro método para aumentar a estereosseletividade é uso de inibidores para bloquear a(s) enzima(s) dando o isômero indesejado. A.C. Dahl e outros (1999), *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 551-559, relataram a redução de etil-3-oxopentanoato com Levedura de padeiro não-tratada com calor e álcool de alila em etil-3-(R)-hidróxi-pentanoato (100% de rendimento

e 92-93% ee). Quando Levedura de padeiro tratada com calor (48° C por 60 minutos) foi usada em combinação com álcool de alila o produto foi obtido em 80-95% de rendimento e o ee foi aumentado para 98%. No entanto, para a reação bem-sucedida uma concentração de substrato de aproximadamente 1 g/L foi usada e 250 vezes de levedura com relação ao substrato, respectivamente 4 vezes de inibidor relativo ao substrato foram requeridas.

Um outro método para influenciar a estereosseletividade de uma redução microbiana é realizar um tratamento com calor das células microbianas, para inativar as enzimas dando o estereoisômeros indesejado. Y. Yashohara e outros (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 847-851, investigaram a redução de etil 4-cloro-3-oxobutirato (COBE) em 4-cloro-(S)-3-hidroxi-butirato (CHBE) com várias leveduras. Células tratadas com acetona de *Candida magnolia* converteram COBE em rendimento molar de 75% em (S)-CHBE com 91,0% ee. Quando as células de *C. magnolia* foram tratadas com calor (60° C), (S)-CHBE foi obtido em um rendimento de 75% com >98% ee. Por outro lado, quando células tratadas com acetona de *Sacharomyces cerevisiae* foram usadas (não-tratadas com calor), (S)-CHBE foi obtido em rendimento molar de 53% e apenas com 14,8% ee. Após tratamento com calor de células de *S. cerevisiae* a 50° C, (S)-CHBE foi obtido em apenas 10% de rendimento com 53,8% ee. (S)-CHBE foi obtido com >98% ee após tratamento com calor a 60° C (8% de rendimento). Em uma escala preparativa, usando *C. magnolia*, 90 g/l de COBE foram convertidos quantitativamente em (S)-CHBE com 96,6% ee dentro de 60 horas, respectivamente, em 97% de rendimento e com >99% ee usando células tratadas com calor. A reação foi realizada em um sistema de duas fases com acetato de n-butila e requereu um sistema de regeneração de co-enzima (glicose, NAD(P) e glicose desidrogenase). A necessidade de um sistema de regeneração de co-fator baseado em glicose desidrogenase é devido à inativação das enzimas endógenas pelo tratamento com acetona.

Z.H. Yang e outros (2004), *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 4871-4875, descreveram também a redução assimétrica de COBE em (S)-CHBE catalisada por levedura. Através de tratamento com calor da levedura (50° C) o ee

de (S)-CHBE aumentou de 84% para 97%, com um aumento no tempo de pré-tratamento de 30 para 120 minutos. Por outro lado a conversão de COBE diminuiu de 96% para 82%. Glicose foi usada para regenerar NAD(P) em NAD(P)H. A reação foi realizada com levedura de levedura de padeiro seca.

5 O procedimento descrito não é útil e econômico para uso em grande escala.

K. Nakamura e outros (1996), Tetrahedron: Asymmetry 7, 409-412, descrevem a redução por levedura de α -dicetonas nos compostos hidroxiceto correspondentes, onde o tratamento com calor influenciou a regioseletividade da reação. Embora, por exemplo, a redução de 1-fenil-1,2-propanodiona com levedura tratada com calor tenha dado 1-fenil-2-hidróxi-1-propanona em 80% de rendimento e >98% ee, a reação requereu uma quantidade relativamente grande de levedura (30 vezes com relação ao substrato).

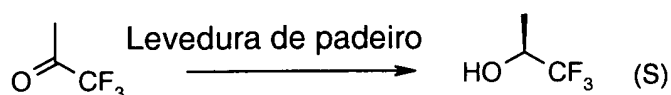
O objetivo da presente invenção é prover um procedimento eficiente para produção de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol de pureza enantiomérica alta (>99% ee).

Foi verificado que a estereosseletividade de Levedura de padeiro comercial excepcionalmente econômica pode ser influenciada por um tratamento com calor definido de modo que 1,1,1-trifluoracetona pode ser reduzida em (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol de ee alto quase quantitativamente.

Nenhum inibidor de enzima e nenhum sistema de regeneração de co-enzima é requerido para atingir a pureza enantiomérica alta desejada de >99%. Felizmente, a inativação do biocatalisador através deste tratamento com calor é limitada suficientemente de modo que ainda uma concentração de substrato tecnicamente relevante pode ser empregada e a quantidade de biomassa (que tem que ser usada para compensação das perdas de atividade) é ainda aceitável para um processamento (*workup*) eficiente. Ainda, um processo de recuperação de produto tecnicamente atraente foi desenvolvido, com base apenas em destilação.

30 A invenção pode ser descrita em mais detalhes como segue:

Esquema 1



Excesso enantiomérico: >99%

A invenção refere-se a um processo biocatalítico escalonável para preparação de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol através de redução microbiana assimétrica de 1,1,1-trifluoracetona com Levedura de padeiro com uma pureza enantiomérica de >99%, compreendendo as etapas:

- 5 a) aquecimento de uma suspensão de Levedura de padeiro em tampão de fosfato de potássio a 0,1-0,4M para 50-52° C durante um período de 60 minutos,
- b) manutenção desta suspensão a 50-52° C durante um período adicional de 90 minutos,
- 10 c) diluição da suspensão aquecida com tampão para uma concentração de levedura de 20-30% p/v e esfriamento para 10° C dentro de 120 minutos,
- d) manutenção do pH constante a 7,4 a 7,5 através da adição automática de solução de KOH a 4M durante todo o processo,
- e) adição de 1,1,1-trifluoracetona para uma concentração de 1-5% (p/v) para
- 15 realização da biotransformação em uma temperatura abaixo do ponto de ebulição de 1,1,1-trifluoracetona,
- f) redução de 1,1,1-trifluoracetona em (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol em uma temperatura de 20° C dentro de 5 a 8 dias, e
- g) isolamento do (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol através de uma seqüência de
- 20 etapas de destilação.

Conforme aqui usado, a "Levedura de padeiro" é uma levedura de padeiro comercial padrão econômica, obtenível em quantidades grandes, por exemplo, da Klipfel AG, Rheinfelden (Suíça).

As condições preferidas são como segue:

- 25 i) a biotransformação é realizada em temperatura ambiente durante um período de tempo de 5-8 dias,
- ii) o tampão usado é tampão de fosfato a 0,1M pH 7-8,
- iii) a concentração do substrato é 2-4% p/v,
- iv) a concentração do substrato é 3% p/v,

- v) a última etapa de destilação é uma retificação,
vi) (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol é usado como um constituinte para APIs em distúrbios psíquicos,
vii) (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol é usado como constituinte para APIs conforme descrito no WO 2005/014563,
5 viii) os APIs conforme descrito no WO 2005/014563 podem ser preparados com uma pureza isomérica de $\geq 99\%$ ee.

O obstáculo de uma redução assimétrica altamente estereosseletiva de 1,1,1-trifluoracetona pela Levedura de padeiro é – conforme também parcialmente mostrado pelas referências citadas – o efeito adverso de tratamento com calor, por um lado aumento da estereosseletividade (obviamente inativando predominantemente as enzimas de redução menos seletivas) e por outro lado diminuindo a atividade (obviamente também inativando a(s) enzima(s) seletiva(s)). Este obstáculo pode ser esperado ser mais pro-

10
15

nunciado em concentrações de substrato mais altas, tecnicamente mais relevantes (mas fisiologicamente menos favoráveis).

Surpreendentemente, foi agora constatado que uma ponte extremamente estreita de condições para um tratamento com calor de Levedura de padeiro existe (50-52^o C por 90-240 minutos) para reduzir significan-

20

temente a atividade da(s) enzima(s) indesejada(s) sem afetar muito a atividade e a estabilidade da(s) enzima(s) seletiva(s).

A tal Levedura de padeiro pré-condicionada pode então ser usada para preparar (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol através de redução de 1,1,1-trifluoracetona – sem uso de um inibidor de enzima adicional – com >99%

25

ee, em uma concentração de substrato ainda tecnicamente relevante e uma concentração de biomassa aceitável de 30% p/v de levedura (10 vezes excesso de levedura com relação ao substrato) permitindo um procedimento de processamento com excelente rendimento.

A redução quase quantitativa do substrato – sem requerer um sistema de regeneração de co-enzima – é da mesma maneira importante

30

para o processo devido ao alto preço do substrato. Foi constatado que há uma faixa de temperatura muito estreita para o tratamento com calor entre

seletividade insuficiente e inativação de catalisador.

Ainda, Levedura de padeiro não está apenas comercialmente disponível, e então nenhum equipamento de fermentação é requerido para preparar o biocatalisador para realizar o processo, mas ela é também excepcionalmente econômica. Isto contribui adicionalmente para a economia do processo.

O processo pode ser também realizado usando Levedura de padeiro de outros fabricantes, por exemplo, da DSM (Dordrecht, Países Baixos), Proofex (Dublin, Irlanda), S.I. de Leuvre Fala (Strasbourg, França), Suomen Hiiva Ou (Lahti, Finlândia) ou Hefe Fabrik Giegold (Schwarzenbach, Alemanha). Em todos os casos o excesso enantiomérico de TFIP produzido na biotransformação seguindo tratamento com calor a 50° C é $\geq 99\%$ (vide Tabela abaixo). Que o tratamento com calor teve um efeito amplamente similar sobre a seletividade de todas as leveduras testadas indica que qualquer Levedura de padeiro comercialmente disponível pode ser usada no processo descrito.

Fornecedor da Levedura	Tratamento com Calor	EtOH (g/L)	Rendimento de TFIP (%)	R-TFIP (%)	S-TFIP (%)
Klipfel	Não	1,1	94,8	2,1	97,9
Klipfel	Sim	0,7	73,5	0,2	99,8
DSM	Não	5,0	88,3	3,1	96,1
DSM	Sim	6,3	67,8	0,4	99,6
Proofex	Não	0,2	31,1	1,5	98,5
Proofex	Sim	0,0	38,8	0,4	99,6
Fala	Não	5,3	96,9	2,2	98,8
Fala	Sim	3,1	80,2	0,2	99,8
Suonenhiva	Não	3,9	91,7	1,9	98,1
Suonenhiva	Sim	4,2	64,7	0,5	99,5
Giegold	Não	7,5	70,0	2,4	97,6
Giegold	Sim	4,7	42,0	0,6	99,4

Os resultados foram obtidos como segue:

50 g de cada levedura foram suspensos para um volume final de 100 ml em tampão de fosfato de potássio a 0,1M pH 7,4 e transferidos para garrafas de vidro de 250 ml. As leveduras suspensas foram submetidas a

5 tratamento com calor a 50° C por 2 horas em um banho de água aquecida. Após esfriamento em gelo as leveduras foram diluídas para 30% p/v com tampão. Alíquotas de 2,5 ml foram então transferidas para garrafas de soro de 10 ml e 86 µl de uma solução de 940 g/L de TFAC em água foram adicionados para dar uma concentração final de 3% p/v. Após fechamento com

10 tampas de borracha as garrafas foram incubadas por 6 dias com giro a 20° C. Periodicamente amostras foram removidas e analisadas através de GC e GC quiral para quantificação de TFAC (1,1,1-trifluoracetona), EtOH (etanol) e TFIP (1,1,1-trifluór-2-propanol) e determinação do excesso enantiomérico do produto.

15 Ainda, e não menos importante, um procedimento de processamento inesperadamente eficiente para recuperação do produto em pureza e rendimento altos deste biocaldo de densidade alta foi encontrado. Este processo é baseado apenas em destilação. Nenhum solvente de extração é usado para recuperação do produto.

20 Para completar o processo para preparação de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol (Esquema 1) pode ser subdividido formalmente em três etapas:

1. Pré-tratamento de Levedura de padeiro

A levedura (2-4 kg) é suspensa em tampão de fosfato de potássio (pH = 7,4) e a suspensão trazida para o volume final desejado de 6 L. A

25 suspensão é aquecida para 50° C durante um período de 60 minutos e mantida nesta temperatura por mais 90 minutos. Após 90 minutos aquecimento é parado e uma porção adicional de tampão de fosfato de potássio frio é adicionada para ajustar a concentração de levedura para 30% p/v. A suspensão é esfriada para 5-20° C durante um período de 90 minutos.

30 2. Biotransformação

1,1,1-Trifluoracetona (0,15-0,3 kg) é adicionada à suspensão de levedura esfriada obtida na etapa 1 e a temperatura é trazida para 20° C. A

5 fim de manter a concentração de etanol no caldo de reação baixa, o pH é mantido a 7,4 a 7,5 através da adição controlada de solução de KOH a 4M. Devido ao ponto de ebulição similar de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol (p.e. 76-77° C) e etanol (p.e. 78° C), uma concentração baixa de etanol na mistura de reação é essencial para isolar (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol livre de etanol em alto rendimento. Este aspecto é uma parte essencial deste procedimento. Opcionalmente, o substrato pode ser adicionado em um processo do tipo "fed-batch".

10 A concentração de substrato usada no presente processo é significativamente maior do que aquelas descritas na técnica anterior. Esta produtividade volumétrica maior resulta em economias de custo consideráveis devido a volumes menores requeridos para reação e isolamento de produto. Uma conversão praticamente completa do substrato foi verificada se o tempo de reação for 5-8 dias.

15 3. Isolamento e purificação de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol

(S)-1,1,1-triflúor-2-propanol é isolado do biocaldo obtido na etapa 2. Na 1ª destilação de batelada o volume do produto é reduzido por um fator de 10 e uma solução de TFIP aquosa de aproximadamente 25% p/p é obtida. Inesperadamente, apesar do teor de biomassa alto (empregado para 20 compensar a perda de atividade da enzima) do biocaldo, o produto pode ser recuperado em rendimento praticamente quantitativo.

Na 2ª destilação em batelada em cloreto de sódio o teor de água do produto é reduzido mais para dar um produto de aproximadamente 90% m/m. Alternativamente, a 2ª destilação em batelada pode ser realizada sem 25 cloreto de sódio, dando um produto de aproximadamente 80% p/p.

Na 3ª destilação, retificação em uma coluna de revestimento (*packed column*), produtos colaterais indesejados tal como traços de 1,1,1-trifluoracetona e etanol não-reagidos são removidos. (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol purificado é obtido finalmente como produto a 95% p/p, com 5% de 30 água e <0,2% de impurezas orgânicas. O teor de etanol é crítico (uma vez que ele poderia reagir na etapa de reação subsequente também e prejudicar a pureza do API) e deve ser <0,5% (p/p) que é um desafio para biotransfor-

mação e processamento.

Opcionalmente, (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol anidro pode ser preparado através da introdução de uma etapa de secagem com peneira molecular antes ou após a última etapa de destilação, ou usando destilação extrativa ou pervaporação.

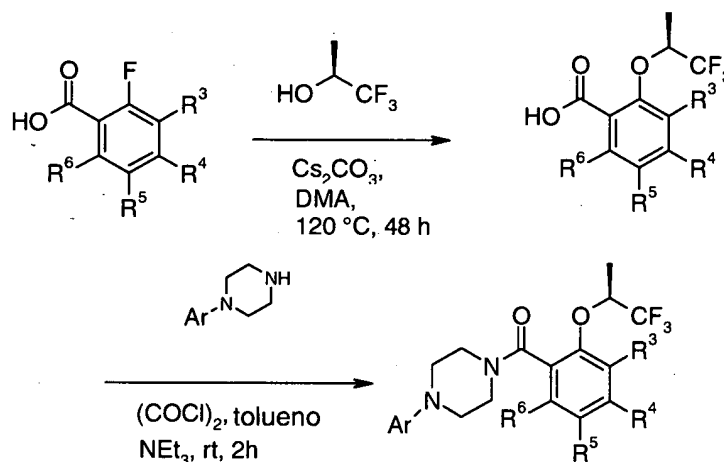
Foi também mostrado que aumento da concentração de levedura para 60% p/v leva a uma redução significativa no tempo de reação (fator 2) necessário para atingir 95% de rendimento, o que potencialmente leva a economias de custo em escala de produção. Efeitos de duplicação da concentração de levedura de a partir de 30% p/v a 60% p/v em biotransformações em escala de 10L são mostrados na tabela abaixo.

Experimento	Concentração de Levedura (p/v)	Tempo de Reação (h)	Rendimento de Biotransformação (%)
A	30 %	66	78
		138	94
B	30 %	66	84
		138	95
C	60 %	66	96
		138	-
D	60 %	66	98
		138	-

Conforme acima mencionado, o (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol obtido pode ser usado como constituinte para a preparação de compostos farmacologicamente ativos, tendo uma porção 1,1,1-trifluorpropan-2-ila S-configurada. Como um exemplo, o Esquema 2 mostra a preparação de compostos farmacologicamente ativos que são inibidores do transportador de glicina usando tal constituinte. Tais compostos são descritas no WO 2005/014563.

Os compostos preparados no Esquema 2 contêm uma porção 1,1,1-trifluorpropan-2-il éter (S)-configurada que é introduzida na molécula através do constituinte (S)-1,1,1-trifluor-2-propanol na penúltima etapa de síntese em uma ramificação de uma síntese convergente (vide Esquema 2).

5 Esquema 2



Nenhum procedimento de cristalização foi encontrado até agora para enriquecer enantiomericamente os intermediários para o API. Deste modo, é essencial usar (S)-1,1,1-trifluor-2-propanol de uma pureza enantiomérica de >99% para a síntese dos APIs.

10 Exemplos

Escala de laboratório

Exemplo 1 (Pré-tratamento de Levedura de padeiro)

3,0 kg de Levedura de padeiro (Blockhefe of Klipfel AG, Rheinfelden, Suíça; nº do produto 101010) foram dispersos em tampão de fosfato de potássio a 0,1M pH 7,4 e o volume levado para 6L (50% p/v) com o mesmo tampão. A levedura suspensa foi então transferida para um reator de vidro de temperatura controlada de 15L. Um agitador montado no alto foi usado para mistura (200 rpm). A suspensão de levedura foi então aquecida da temperatura ambiente para 50°C em um período de 60 minutos e a temperatura mantida neste valor por mais 90 minutos. Neste ponto aquecimento foi parado. Mais 4L de tampão frio (4°C) foram então adicionados para trazer o volume total para 10L (30% p/v de levedura). O caldo foi esfriado para 10°C durante um período de cerca de 90 minutos. Um valor de pH de 7,4 a 7,5 foi mantido pela adição automática de solução de KOH a 4M usando um

pH-stat.

Tratamento com Calor		
Tempo (min)	Temperatura (°C)	Solução de KOH a 4M consumida (g/L)
0	24,3	2
20	35,0	2,6
45	47,8	4
60	49,2	5,8
90	49,4	10,4
150	49,4	16,8
160	43,3	n.d.
170	28,9	19,6
195	24,3	21,2
215	18,3	24,2
245	11,2	26,2

Exemplo 2 (Biotransformação)

304 g de 1,1,1-trifluoracetona foram adicionados ao caldo esfria-
do (10 L) e a temperatura foi mantida a 20°C por toda a duração da reação
5 que foi de 5 dias neste caso. O caldo de reação no recipiente foi continua-
mente revestido com nitrogênio (razões de segurança). O pH foi mantido a
7,4 a 7,5 através da adição automática de solução de KOH a 4M de um *pH-*
stat. Periodicamente, amostras foram removidas e analisadas através de GC
e a GC quiral para quantificação de TFAC (1,1,1-trifluoracetona), EtOH (eta-
10 nol) e TFIP (1,1,1-trifluór-2-propanol) e determinação do excesso enantiomé-
rica do produto.

Biotransformação					
Tempo de Re- ação (h)	TFAC (g/L)	EtOH (g/L)	TFIP (g/L)	R-TFIP (%)	S-TFIP (%)
1	23,0	2,3	0,7		
2,5	19,5	2,8	2,8		
71	4,6	2,4	21,5	0,4	99,6
90	2,5	2,5	24,1		
96,5	3,1	2,2	24,0		
117	2,7	2,3	24,7		
144	2,4	2,0	24,0		

Exemplo 3 (Isolamento de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol a partir do biocaldo e seu enriquecimento)

- 10,9 kg de biocaldo foram transferidos para um rotavapor Büchi R152 com frasco de fundo redondo de 20 L, equipado com uma armadilha criogênica (*cold trap*) (gelo seco). A destilação foi realizada em temperatura de banho de 60° C a 1,4kpa (140 mbar) de vácuo e temperatura de condensador de 15° C. A temperatura de destilação observada era 55° C. A Fração 1 (vide abaixo) foi combinada com o produto obtido na armadilha criogênica (solução bifásica). A composição do produto foi analisada através de GC.

1ª destilação				
Descrição do produto	Peso (g)	TFAC (g)	EtOH (g)	TFIP (g)
Biocaldo	10919,0	26,2	21,8	262,2
Fração 1 & Produto da Armadilha criogênica	1001,9	20,7	4,7	258,8
Fração 2	548,4	4,3	3,4	1,0
Reservatório de destilação	9539,0	1,2	13,8	2,5

Ao produto da 1ª destilação (fração 1 e produto da armadilha criogênica) foram adicionados 300 g de cloreto de sódio e a mistura foi agitada por uma hora. Uma mistura de TFIP, fase aquosa e cloreto de sódio foi

obtida. A mistura toda foi transferida para um rotavapor Büchi R124 com um frasco de fundo redondo de 2L. A destilação foi realizada a 90-98° C de temperatura de banho em pressão ambiente e em 15° C de temperatura do condensador. Uma primeira fração de TFIP foi obtida a 82-85° C, uma segunda fração a 85-98° C.

2ª destilação					
Descrição do produto	P.e. (°C)	Peso (g)	TFAC(g)	EtOH (g)	TFIP (g)
Produto da 1a destilação/NaCl		1301,9	20,7	4,7	258,8
Fração 1	82-85	287,1	12,2	7,8	254,6
Fração 2	85-98	9,2	0,3	0,5	7,5
Recipiente de destilação		1003,1	0,1	6,9	3,8

O Produto obtido através da combinação das frações 1 e 2 foi usado para a destilação final.

Exemplo 4 (Purificação final de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol)

10 625 g de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol enriquecido obtido após a 2ª destilação de duas reações de biotransformação na escala de 10L foram usados para a destilação fracional final. A destilação foi realizada usando um frasco de fundo redondo de 1 L conectado a uma coluna de destilação de 5 x 150 cm (Sulzer packing BX). A coluna foi equipada com um divisor de refluxo no alto. A destilação foi realizada em temperatura de banho de 150° C em pressão ambiente e em temperatura de condensador de 5° C. A razão de refluxo selecionada (1:20 a 1:99) era dependente da qualidade do produto obtido (através de monitoramento em GC). O tempo para retirada de destilado foi 1 segundo.

3ª destilação						
Descrição do produto	RLV	P.e. (°C)	Peso (g)	TFAC (g)	EtOH (g)	TFIP (g)
Material de partida	-		624,6	9,11	37,58	546,6
Fração 1	1: 20	59,0 - 76,4	86,0	8,69	0,08	76,0
Fração 2	1: 20	76,4 - 76,7	49,5	0,61	0,00	49,1
Fração 3	1: 20	76,7 - 76,8	49,1	0,28	0,00	50,3
Fração 4	1: 20	76,8 - 76,9	51,4	0,15	0,00	54,4
Fração 5	1: 20	76,9	47,7	0,08	0,00	50,9
Fração 6	1: 20	76,9	46,9	0,05	0,00	48,99
Fração 7	1: 40	76,9	26,4	0,02	0,02	27,56
Fração 8	1: 40	76,9 - 77,0	28,3	0,04	0,04	28,62
Fração 9	1: 40	77,0 - 77,4	33,7	0,03	0,18	35,01
Fração 10	1: 40	77,4 - 78,2	22,7	0,02	0,49	23,51
Fração 11	1: 40	78,2 - 78,3	3,26	0,01	0,14	2,88
Fração 12	1: 99	78,3 - 79,1	31,8	0,04	2,42	27,36
Fração 13	1: 99	79,1 - 79,3	23,1	0,02	3,27	16,81
Recipiente de destilação	-		108,4	0,35	35,87	64,39

O Produto final obtido através da combinação das frações 2 a 8 (299 g) mostrou os dados analíticos que seguem:

Identidade através de RMN (CDCl₃) e HPLC/MS: de acordo;

- 5 composição (GC): 94,8% p/p TFIP, 0,4% p/p TFAC, 0,02% p/p etanol;
 teor de água (Karl-Fisher): 4,8% p/p;
 excesso enantiomérico (GC quirai): 99,3%

Preparação em grande escala

Exemplo 5 (Pré-tratamento de Levedura de padeiro)

a) Tratamento com calor de Levedura de padeiro:

Um recipiente de reação de aço inoxidável de 800 L foi enchido com 240 L de tampão de fosfato a 0,1M de pH 7,5 esfriado para 10° C. O tampão foi preparado através da dissolução de 10,88 kg de diidrogeno fosfato de potássio (no. do produto 60220; Fluka/Suíça) e 4,08 kg de hidróxido de potássio (no. do produto 60370; Fluka/Suíça) em 804 L de água deionizada, 240 kg de Levedura de padeiro (no. do produto 104020, Sackhefe; Klipfel AG, Rheinfelden/Suíça) foram adicionados com agitação. A mistura foi agitada mais a 10° C por 60 minutos para homogeneizar a suspensão de levedura. A sonda de temperatura mergulhando na suspensão foi instalada e o reator foi inertizado. A suspensão de levedura foi aquecida para 50,3° C (+/- 0,5° C) dentro de 83 minutos e mantida a 50,3° C (+/- 0,5° C) por 90 minutos. Então 320 L de tampão de fosfato a 0,1M pH 7,5 de 10° C foram adicionados e a mistura foi esfriada para 10° C dentro de 67 minutos. Durante tratamento com calor o valor do pH da suspensão foi mantido em pH 7,5 através da adição controlada (*pH-stat*) de uma solução de hidróxido de potássio a 50% (12,0 kg). A suspensão de levedura preparada foi armazenada temporariamente a 10° C no recipiente de reação por 25 horas, mantendo o controle do pH de 7,5 (5,8 kg de solução de hidróxido de potássio a 50% consumidos).

b) Teste de uso de Levedura de padeiro tratada com calor:

Um teste de uso foi realizado para verificar a atividade/estereosseletividade desejada da levedura preparada antes da adição da 1,1,1-trifluoracetona cara. 2L da suspensão de levedura tratada com calor foram postos em um reator de vidro de laboratório de 2L. 60 g de 1,1,1-trifluoracetona foram adicionados com agitação à suspensão esfriada (10° C). A mistura de reação foi subsequentemente aquecida para 21° C dentro de 60 minutos. Durante a biotransformação o valor do pH da mistura de reação foi mantido em pH 7,5 através da adição controlada (*pH-stat*) de uma solução de hidróxido de potássio a 25% (16 g adicionados dentro de 20 horas). (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol foi obtido em rendimento de 32% e 99,2%

ee após 20 horas de tempo de reação (critérios de teste: >25% de rendimento de >98,9% ee após 15-30 horas de tempo de reação).

Exemplo 6 (Biotransformação)

24,7 kg de 1,1,1-trifluoracetona gelada foram transferidos através de um tubo de imersão dentro de 55 minutos para a suspensão de levedura esfriada (10° C) com agitação. Após agitar por mais 20 minutos a temperatura da mistura de reação foi aumentada para 20° C dentro de 55 minutos. Durante a biotransformação o valor do pH da mistura de reação foi mantido em pH 7,5 através da adição controlada (*pH-stat*) de uma solução de hidróxido de potássio a 50% (16,8 kg consumidos dentro de 159 horas). (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol foi obtido em 96% de rendimento e 99,4% ee após tempo de reação de 159 horas. 860 kg de mistura de reação foram obtidos. A mistura de reação foi então armazenada por 1 dia a 20° C e 3 dias a 6° C antes do início da recuperação do produto de destilação.

Exemplo 7 (Isolamento de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol a partir do biocaldo e seu enriquecimento)

a) Primeira destilação:

A destilação foi realizada fora do recipiente de reação que era equipado com um condensador. A destilação foi realizada a 60° C de temperatura de revestimento, pressão de 1,4 Kpa (140 mbar) e temperatura do condensador de 6-8° C. Para prevenir espumação excessiva 0,5 kg de anti-espumante Basildon (no. do produto BC 86/013; Basildon Chemical Company Ltd/Inglaterra) foi adicionado. A composição do produto foi analisada através de GC. A destilação deu 101 kg de produto da etapa 1, incl. produto na armadilha criogênica de gelo seco. A composição do produto era 19,8 m/m-% de 1,1,1-triflúor-2-propanol, 0,2% de 1,1,1-trifluoracetona, 2,5% de etanol e 77,5% de água.

b) Segunda destilação:

A destilação do produto da etapa 1 foi feita em três bateladas cada uma de aproximadamente 30L em um rotavapor Büchi R187 com um frasco de destilação de 50 L. Em uma temperatura de banho de 90° C e uma temperatura de condensador de 12-15° C uma primeira fração foi tomada em

pressão normal até que a temperatura do cabeçote caiu para $<60^{\circ}\text{C}$. Uma segunda fração foi tomada a 7 kpa (700 mbar) e uma terceira fração de 5 kpa (500 mbar). A qualidade das frações obtidas foi analisada com GC e agrupamento de frações apropriadas foi feito de acordo com um critério de pureza preajustado usando cálculo de Excel (razão de 1,1,1-triflúor-2-propanol para etanol > 15). No total 28,5 kg de produto da etapa 2 foram obtidos. A composição do produto era 79,3 m/m-% de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol, 0,7% de 1,1,1-trifluoracetona, 4,9% de etanol e 15,2% de água.

c) Terceira destilação:

10 A destilação do produto da etapa 2 foi realizada em duas bateladas cada uma de aproximadamente 14 kg em uma coluna de retificação de 5 x 150 cm (Sulzer packing BX) com um frasco de fundo redondo de 20 L. A coluna foi equipada com um divisor de refluxo no alto. A destilação foi realizada em temperatura de banho de 115°C , pressão ambiente e temperatura de condensador de 5°C . A razão de fluxo selecionada (1:10 a 1:50) era dependente da qualidade do produto obtido (através de monitoramento em GC). O tempo para retirada de destilado era 1 s. Agrupamento de frações de produto puro apropriadas foi feito de acordo com os critérios de pureza preajustados usando cálculo de Excel. (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol puro, contendo 5% de água azeotrópica e $<0,1\%$ de etanol, destilou a $76,7^{\circ}\text{C}$ a $76,8^{\circ}\text{C}$. A destilação em duas bateladas deu 20,5 kg de produto da etapa 3 (critérios: $\geq 90\%$ de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol, $\leq 0,5\%$ de etanol) e 2,2 kg de produto secundário da etapa 3 (critérios: $\geq 80\%$ de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol, $\leq 5\%$ de etanol) que por sua vez renderam mais 1,4 kg de produto da etapa 3 após redestilação. No total, a destilação fracional deu 21,8 kg de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol purificado.

Propriedades de (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol produzido:

O produto agrupado da destilação (21,8 kg) mostrou os dados analíticos que seguem:

30 Identidade através de RMN (CDCl_3) e HPLC/MS: de acordo;
composição (GC): 95,1% p/p de TFIP, $<0,1\%$ p/p de TFAC, 0,1% p/p de etanol;

teor de água (Karl-Fisher): 5,2% p/p;
excesso enantiomérico (GC quiral): 99,4%.

Referências:

- Crawford, J. W. C. *Journal of the Chemical Society (C)* (1967), 2332-2333:
5 Resolution of 1-trifluoromethylethanol. Part II.
- Rosen T.C., Dausmann T., *Chimica Oggi* (2004) Suppl, 43-45: Biocatalyst vs. chemical catalyst for asymmetric reduction. Product list (2004) of Jülich Fine Chemicals GmbH, Jülich (Germany).
- Bucciarelli M., Forni A., Moretti I. and Torre G., *Synthesis* (1983) **11**, 897-
10 899: Asymmetric reduction of trifluoromethyl and methyl ketones by yeast; an improved method.
- Dahl A.C., Fjeldberg M. and Madsen J.O., *Tetrahedron: Asymmetry* (1999) **10**, 551-559: Baker's yeast: improving the D-stereoselectivity in reduction of 3-oxo esters.
- 15 Yasohara Y., Kizaki N., Hasegawa J., Takahashi S., Wada M., Kataoka M., Shimizu S., *Appl Microbiol Biotechnol* (1999) **51**: 847-851: Synthesis of optically active ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate by microbial reduction.
- Yang Z.-H., Yao S.-J. and Lin D.-Q., *Ind. Eng. Chem. Res.* (2004) **43**, 4871-
20 4875: Improving the stereoselectivity of asymmetric reduction of 3-oxo ester to 3-hydroxy ester with pretreatments on bakers' yeast.
- Nakamura K., Kondo S., Kawai Y., Hida K., Kitano K. and Ohno A., *Tetrahedron: Assymetry* (1996) **7**, 409-412: enantio- and regioselective reduction of alpha-diketones by baker's yeast.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo biocatalítico escalonável para a preparação de S-1,1,1-triflúor-2-propanol com um excesso enantiomérico de >99% através de redução microbiana assimétrica de 1,1,1-trifluoracetona com Levedura de
5 padeiro compreendendo as etapas:
 - a) aquecimento de uma suspensão de Levedura de padeiro em tampão de fosfato de potássio a 0,1-0,4M para 50-52° C durante um período de 60 minutos,
 - b) manutenção desta suspensão a 50-52° C durante um período adicional de
10 90 minutos,
 - c) diluição da suspensão aquecida com tampão para uma concentração de levedura de 20-30% p/v e esfriamento para 10° C dentro de 120 minutos,
 - d) manutenção do pH constante a 7,4 a 7,5 através da adição automática de solução de KOH a 4M durante todo o processo,
 - 15 e) adição de 1,1,1-trifluoracetona para uma concentração de 1-5% (p/v) para realização da biotransformação em uma temperatura abaixo do ponto de ebulição de 1,1,1-trifluoracetona,
 - f) redução de 1,1,1-trifluoracetona em (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol em uma temperatura de 20° C dentro de 5 a 8 dias, e
 - 20 g) isolamento do (S)-1,1,1-triflúor-2-propanol através de uma seqüência de etapas de destilação.
2. Processo biocatalítico de acordo com a reivindicação 1, onde a biotransformação é realizada em temperatura ambiente durante o período de 5-8 dias.
- 25 3. Processo biocatalítico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tampão usado é tampão de fosfato a 0,1M pH 7-8.
4. Processo biocatalítico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração do substrato é 2-4% p/v.
- 30 5. Processo biocatalítico de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a concentração do substrato é 3% p/v.
6. Procedimento de isolamento como definido na reivindicação 1,

onde a última etapa de destilação é uma retificação.

7. Uso de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol como definido nas reivindicações 1-6 como constituintes para APIs em distúrbios psíquicos.

5 8. Uso de (S)-1,1,1-trifluór-2-propanol como definido nas reivindicações 1-7 como constituinte para APIs conforme descrito no WO 2005/014563.

9. Processo biocatalítico como definido nas reivindicações 1-8, onde os APIs conforme descrito no WO 2005/014563 podem ser preparados com uma pureza isomérica de >99% ee.

10 10. A invenção conforme aqui anteriormente descrito.

PI 0614045-9

RESUMO

Patente de Invenção: "**REDUÇÃO ASSIMÉTRICA DE 1,1,1-TRIFLUORACETONA**".

5 A presente invenção refere-se a um processo biocatalítico escalonável para a preparação de S-1,1,1-trifluor-2-propanol com um excesso enantiomérico de >99% através da redução microbiana assimétrica de 1,1,1-trifluoracetona com Levedura de padeiro.