

ANA CAROLINA DE TOLEDO SANTANA

Avaliação da promiscuidade catalítica de soroalbuminas em
sínteses orgânicas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientadora: Prof. Dra. Cintia Duarte Freitas Milagre

ARARAQUARA
2016

ANA CAROLINA DE TOLEDO SANTANA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 26 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Cintia Duarte de Freitas Milagre (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Alvaro Takeo Omori
Centro de Ciências Naturais e Humanas / UFABC / Santo André - SP

Dados Pessoais

Nome: Ana Carolina de Toledo Santana
Filiação: Valdeci Santana
Liliane de Toledo Santana
Data de nascimento: 19 de Setembro de 1991
Naturalidade: Guarulhos/SP
Nacionalidade: Brasileira
Estado civil: Solteira
Endereço residencial: Rua São Bento, 807 – Apartamento 82 – Centro – Araraquara/SP

Formação Acadêmica

- Ensino Fundamental

Cantinho da Alegria E.E.I 1995-1997.
Colégio Guglielmo Marconi 1998-2005

- Ensino Médio

Colégio Progesso Centro 2006-2008

- Ensino Superior

Graduada no curso de Tecnologia em Processos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná no período de 2010 a 2013.

- Curso de pós-graduação modalidade Mestrado em química, área de concentração: Química Orgânica, Título: “*AValiação da Promiscuidade Catalítica de Soroalbuminas em Sínteses Orgânicas*” sob a orientação da Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, no Instituto de Química, UNESP, Araraquara, no período de 2014 a 2016 com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Estágio, Projeto de Extensão e Bolsas de Auxílio

- Projeto de extensão “*Programa de Gestão de Resíduos Laboratoriais do Campus Apucarana da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)*.” sob a orientação da Prof. Dra. Leila Droprinchinski Martins no período de 2010-2011.

- Estágio no laboratório de qualidade da empresa Brazilian Pet Foods no período de 2011 – 2012.

- Bolsa de monitoria nas disciplinas de Físico-Química e termodinâmica no período de 03/2013 – 07/2013.

- Bolsa de mestrado no período de 03/2014 – 02/2016, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior.

Apresentação de Trabalhos em Congressos

- SANTANA, A. C. T; MILAGRE, C. D. F. Albumin as a catalyst for c-c bond formation, no 16th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, realizado em Búzios/RJ, de 15 a 18

de Novembro de 2015.

- SANTANA, A. C. T., BARON, A. M., TURBIANI, F.R.B., GARCIA, P.S., KRIEGER, N., RASSERA, K. Imobilização de Lipases em Biofilmes de Sericina para Utilização em Biocatálise. II Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 2013, Londrina.

- SANTANA, A. C. T., BARON, A. M., GARCIA, P.S., TURBIANI, F.R.B. Imobilização de Lipases em Biofilmes de Sericina II SEMATEQ, 2013, Apucarana.

Participação em Eventos

- 16th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2015.

- Unesp NMR Symposium: Recent Advances in NMR Spectroscopy, 2014.

- II Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 2013.

- II SEMATEQ, 2013.

- I SEMATEQ, 2011.

- EXPO UT, 2010.

Quero dedicar este trabalho para meus pais Valdeci e Liliâne, e para meu irmão Douglas. Por estarem sempre ao meu lado, acreditarem em meus sonhos e pelo amor incondicional. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais por me apoiarem em todas as minhas decisões até aqui. Obrigada por todo amor, pela minha educação, os conselhos e principalmente por todos os esforços que vocês fizeram para que eu me tornasse o que sou hoje. Valdeci e Liliane, vocês são as pessoas em que eu me espelho, sou muito grata à Deus por ter me abençoado com uma mãe e um pai como vocês, muito obrigada. Amo muito vocês dois.

Para meu irmão Douglas, por ser essa pessoa tão maravilhosa. Meu irmãozinho mais novo que me ensina tanta coisa. Sem você minha vida não teria sido tão feliz como ela foi, obrigada por ter compartilhado de uma infância sensacional, guardar meus segredos, conhecer e entender todos os meus medos. Te amo demais!

Minhas avós lindas, Hilma e Raimunda, obrigada por todas as palavras de sabedoria e orações. Sem dúvidas, vocês são minhas companheiras, pessoas as quais me incentivam todos os dias como enfrentar a vida, muito obrigada!

Aos meus familiares, meu tio Marcelo, meus primos Natália e Maurício, e meus avós José Luiz e Damião (in memoriam). Pessoas que sempre torceram para meu sucesso, e a minha felicidade acima de tudo. Muito obrigada, vocês são essenciais na minha vida.

À Prof. Dra Cintia Duarte Freitas Milagre. Muito obrigada pela orientação, pela paciência, por seu constante incentivo, pela confiança e por acreditar na minha capacidade.

Ao grupo de pesquisa Milagre Research Group Raquel, Luna, Milena, Maraylla e João pelas discussões e aprendizado. Em especial, ao Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre por ter contribuído na minha formação.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques e sua aluna de mestrado Caroline Rocha, pela síntese das nanopartículas magnéticas.

À Prof. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira pela contribuição no desenvolvimento do planejamento fatorial completo.

Às grandes amigas que fiz em Araraquara Luna, Mariana, Larissa e Bruno, por todos os momentos que passamos juntos, pelas conversas, almoços, cafés e cervejas. Vocês se tornaram minha família, e eu não poderia ter encontrado pessoas melhores na minha vida, obrigada por tudo.

À Prof. Dra. Lourdes Campaner dos Santos e Prof. Dra. Lúcia Maria Xavier Lopes pelas análises de HPLC. E também para Dra. Juliana Rodrigues, MSc. João Luiz Bronzel Júnior e MSc. Marcos Donizete pelo auxílio durante as análises.

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Química pela infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

E para todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada.

*“Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima tentativa eu consegui.
Nunca Desista de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis. A
próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”*

Albert Einstein

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e vencer com ousadia,
Porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante”*

Charles Chaplin

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar a atividade catalítica de soroalbumina bovina (BSA) em reações formadoras de uma nova ligação C-C: Reações aldólica, de Henry e Morita-Baylis-Hillman (MBH). Em todos os casos a BSA atuou como catalisador, visto que quando as reações foram realizadas sem sua presença, não houve formação dos produtos desejados. Os rendimentos obtidos para as reações aldólica (37%), Henry (80%) e MBH (73%), variaram de bons a moderados e não foi observada enantiosseletividade para nenhuma das reações estudadas. As soroalbuminas são proteínas que formam muita emulsão dificultando os processos *downstream* na separação dos produtos e materiais de partida. Visando minimizar este inconveniente, a BSA foi submetida à imobilização em M-CLEA (*magnetic cross-linking enzyme aggregates*) utilizando nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Nestes casos, o biocatalisador pôde ser facilmente retirado do meio reacional com aplicação de um campo magnético externo. Esta metodologia afetou diretamente no rendimento da reação de Henry, passando de 80% para 89%. Porém, para as outras reações a melhoria no rendimento não foi tão expressiva. A imobilização também não foi eficaz para o aumento dos excessos enantioméricos. Até o momento para a reação de MBH com os substratos utilizados, não há relatos na literatura para a síntese do aduto desejado catalisado pela BSA. Sendo assim, optamos por realizar um planejamento fatorial completo dessa reação visando otimizar as condições reacionais bem como os rendimentos. As variáveis estudadas foram: temperatura, concentração do biocatalisador e condição do biocatalisador (livre ou imobilizado). Os resultados obtidos mostraram que a variável com maior influência na reação, é a concentração do biocatalisador. A conversão obtida passou de 30% para 40% utilizando 2,2 μmol de BSA. Em seguida, realizamos um estudo de ascendência da concentração do catalisador visando otimizar este parâmetro. A conversão obtida passou para 73% quando foram utilizadas 3,7 μmol de biocatalisador imobilizado. Realizamos um estudo de reciclagem do biocatalisador imobilizado. Foi possível reutiliza-lo porém com diminuição da conversão a partir do segundo ciclo. Os resultados obtidos nesta dissertação evidenciam o potencial biocatalítico da BSA em reações para a formação de ligação C-C.

Palavras-chave: Biocatálise. Soroalbumina. Formação de ligação carbono-carbono. Imobilização. Nanopartículas magnéticas.

ABSTRACT

This work aimed to study the catalytic activity of bovine serum albumin (BSA) in reactions that form a new C-C bond: aldol reactions, Henry and Morita-Baylis-Hillman (MBH). In all cases BSA served as the catalyst, whereas when the reactions were carried out without their presence there was no formation of the desired products. The yields obtained for aldol reactions (37%), Henry (80%) and MBH (73%), ranged from good to moderate enantioselectivity and was not observed for any of the studied reactions. The serum albumins are proteins that form the much emulsion difficulting downstream processes in separation of the products and starting materials. To minimize this inconvenience, the BSA was subjected to immobilization in M-CLEA (magnetic cross-linking enzyme aggregates) using magnetic nanoparticles of iron oxide. In these cases the biocatalyst could be easily removed from the reaction medium by applying an external magnetic field. This methodology directly affect the yield of the Henry reaction, from 80% to 89%. However, for other reactions the improvement of yields was less pronounced. The immobilization was also not effective for improving the enantiomeric excess. So far for the MBH reaction with the worked substrates, there are no reports in the literature for the synthesis of the desired adduct catalyzed by BSA. So we decided to study a full factorial design of this reaction to optimize the reaction conditions and yields. The variables studied were: temperature, the biocatalyst concentration and biocatalyst conditions (free and immobilized). The concentration of biocatalyst was the major factor with interference in all reactions. The conversion increased from 30% to 40% using 2.2 μmol of BSA. Then we perform a study of catalyst concentration to optimize this parameter. The conversion increased to 73% when they were used 3.7 μmol immobilized biocatalyst. To evaluate the retention of catalytic activity of BSA immobilized, it was performed a study of the immobilized biocatalyst recycling. It was possible the reuse but with reduced conversion from the second cycle. The results obtained in this work demonstrated the potential of BSA in C-C bond formation reactions.

Keywords: Biocatalysis. Serum albumin. Carbon-Carbon bond formation. Immobilization. Magnetic nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais vantagens da Biocatálise.	20
Figura 2 - Representação cristalográfica da soroalbumina humana (HSA).	24
Figura 3 - Breve perspectiva histórica dos estudos com a albumina.	25
Figura 4 - Estrutura terciária da albumina determinada por Carter em 1992.	26
Figura 5 - Representação da estrutura secundária da BSA. a) Destaque para os resíduos de aminoácidos com caráter básico; b) Aproximação dos resíduos básicos.	27
Figura 6 – Representação esquemática do método para obtenção do CLEA.	30
Figura 7 - Representação esquemática para o preparo do M-CLEA.	31
Figura 8 - Exemplos de compostos bioativos sintetizados através da reação aldólica.	34
Figura 9 - Exemplos de fármacos a partir de intermediários β -nitroalcoólicos.	38
Figura 10 - Exemplos de compostos bioativos sintetizados a partir de adutos de MBH.	40
Figura 11 - Auxiliares quirais utilizados na reação de MBH.	41
Figura 12 - Fármaco anti-hipertensivo que utiliza o composto 4 como bloco construtor.	42
Figura 13 - Espectros no infravermelho pelo modo ATR: a) Nanopartícula magnética; b) BSA; c) BSA imobilizada nas nanopartículas magnéticas.	50
Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura para BSA imobilizada. a) Nanopartícula Magnética; b) BSA; c) BSA imobilizada	51
Figura 15 - Cromatograma da reação de MBH. a) L-prolina 40 °C; b) Produto 5 puro; c) BSA.	63
Figura 16 - Gráfico de propabilidade.	69
Figura 17 - Reuso da BSA imobilizada em nanopartículas de óxido de ferro.	71
Figura 18 - Espectro de massas (ESI-(+)-MS) para o composto 4 .	73
Figura 19 - Cromatograma obtido para a Reação de Biginelli.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de promiscuidade enzimática.	23
Tabela 2 - Possíveis resíduos de aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica da BSA.	26
Tabela 3 - Resultados obtidos para a síntese de 2 .	53
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H para o composto 2 (CDCl_3 , 300,19).	55
Tabela 5 - Resultados obtidos na síntese de 3 utilizando a BSA livre e imobilizada.	58
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H para o composto 3 (CDCl_3 , 300,19).	59
Tabela 7 - Catalisadores testados na síntese do composto 3 .	60
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H para o composto 5 (CDCl_3 , 300,19).	61
Tabela 9 - Influência da temperatura na reação de MBH.	64
Tabela 10 - Resultados obtidos após otimização da reação de MBH para a síntese de 5 .	65
Tabela 11 - Planejamento fatorial completo para a reação de MBH.	67
Tabela 12 - Valores do efeitos das variáveis estudadas no PFT.	68
Tabela 13 - Caminho de ascendência variando a concentração do catalisador.	69
Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H para o composto 4 (CDCl_3 , 300,19).	72

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Síntese da (<i>R</i>)-mandelonitrila utilizando uma emulsão enzimática de amendôas amargas.	20
Esquema 2 - Exemplo primeira aplicação em síntese orgânica da BSA na redução de cetonas aromáticas.	27
Esquema 3 - Proposta mecanística para obtenção do CLEA.	29
Esquema 4 - Reação aldólica: Produtos de adição e condensação.	33
Esquema 5 – Reações aldólicas catalisadas por ácidos e bases.	35
Esquema 6 - Reação de Henry.	36
Esquema 7 - Mecanismo proposto para a reação de Henry.	36
Esquema 8 - Mecanismo proposto para a reação de Cannizzaro.	37
Esquema 9 - Utilidade sintética da reação de Henry.	38
Esquema 10 - Reação de Morita-Baylis-Hillman.	39
Esquema 11 - Mecanismo proposto para a reação de MBH.	39
Esquema 12 - Reação de Biginelli.	42
Esquema 13 - Mecanismos aceitos para a síntese de DHPMs.	43
Esquema 14 - Moléculas alvo pretendidas.	46
Esquema 15 - Síntese das nanopartículas de óxido de ferro.	49
Esquema 16 - Funcionalização das nanopartículas utilizando o APTES.	49
Esquema 17 - Imobilização da BSA por M-CLEA.	50
Esquema 18 - Reação aldólica reproduzida para a síntese de 2 utilizando a BSA livre ou imobilizada.	53
Esquema 19 - Proposta mecanística para a formação de 2 utilizando a BSA como biocatalisador.	56
Esquema 20 - Síntese de 3 utilizando <i>i</i> -propanol/água como solvente da reação nitroaldólica.	56
Esquema 21 - Síntese de 3 utilizando água como solvente na reação nitroaldólica.	57
Esquema 22 - Proposta mecanística para a síntese de 3 utilizando a BSA como catalisador da reação.	60
Esquema 23 - Reação de MBH para a síntese do composto 5 .	61
Esquema 24 - Reação de MBH utilizando a BSA como catalisador.	62
Esquema 25 - Proposta mecanística para a formação do produto aldólico.	64

Esquema 26 - Reação de MBH otimizada.	65
Esquema 27 - Proposta mecanística para a reação de MBH utilizando a BSA	66
Esquema 28 - Reação de MBH otimizada para os parâmetros estudados.	70
Esquema 29 - Reação de Biginelli para a síntese de 4 .	72
Esquema 30 – Proposta mecanística para formação de DHPM catalisado pela BSA.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

- APTES – (3-aminopropil)trietóxisilano
- BSA – Soroalbumina bovina
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CCDP – Cromatografia em camada delgada preparativa
- CD – Dicroísmo circular
- CLEA – *Cross-linking enzyme aggregates*
- CLEC – *Cross-linking enzyme crystals*
- DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
- DHPMs – Dihidropirimidinonas
- DMAP – 4-dimetilaminopiridina
- DMF – *N,N*-dimetilformamida
- DSC – Cromatografia em sílica seca (*dry silicon chromatography*)
- ee – Excesso enantiomérico
- GC-FID – Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- HSA – Soroalbumina humana
- IV – Infravermelho
- MBH – Morita-Baylis-Hillman
- M-CLEA – *Magnetic cross-linking enzyme aggregates*
- MCR – Reações multicomponentes
- MVK – Metil vinil cetona
- PFT – Planejamento fatorial completo
- RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13
- RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1

SUMÁRIO

1 Introdução	19
1.1 Biocatálise: Aspectos gerais	19
1.2 Promiscuidade catalítica	22
1.3 Soroalbuminas	23
1.4 Imobilização de Biocatalisadores	28
1.4.1 <i>Cross-linking enzyme aggregates</i> (CLEA)	28
1.4.2 <i>Magnetic-Cross-linking enzyme aggregates</i> (M-CLEA)	30
1.5 Reações orgânicas para a formação de ligação C-C catalisadas pela BSA	32
1.5.1 Reação Aldólica	32
1.5.2 Reação de Henry (Nitroaldol)	36
1.5.3 Reação de Morita-Baylis-Hillman	38
1.5.4 Reação de Biginelli	41
1.6 Engenharia do Meio Reacional e Planejamento Fatorial Completo	44
2 Objetivos	46
2.1 Objetivo Geral	46
2.2 Objetivos Específicos	46
3 Resultados e Discussão	49
3.1 Imobilização da BSA em Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro	49
3.2 Reação Aldólica	52
3.3 Reação de Henry	56
3.4 Reação de Morita-Baylis-Hillman	61
3.5 Engenharia do Meio Reacional para a Reação de MBH	66
3.6 Reutilização do Biocatalisador	70
3.7 Reação de Biginelli	71
4 Considerações Finais	77
5 Procedimento Experimental	80
5.1 Considerações Gerais	80
5.1.1 Reagentes e solventes	80
5.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H)	80
5.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ¹³ C)	80
5.1.4 Cromatografia Gasosa Acoplada a um Detector de Ionização de Chamas (GC-FID)	80
5.1.5 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)	81
5.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	81
5.1.7 Cromatografia em Camada Delgada e Tubular	82
5.1.8 Espectroscopia no Infravermelho (IV)	82
5.1.9 Microscopia Eletrônica de Varredura Convencional (MEV)	82
5.1.10 Espectrometria de Massas	83
5.2 Síntese dos padrões 2, 3, 4 e 5	83
5.2.1 Síntese do composto 4-hidroxi-4-(8-nitrofenil)butan-2-ona (2).	83
5.2.2 Síntese do composto 1-nitro-2-hidroxi-2-(4-nitrofenil)-etanol (3).	84

5.2.3 Síntese do composto 1,2,3,4-tetrahidro-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-tioxopirimidina-5-carboxilato de etila (4) .	86
5.2.4 Síntese do composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)-3-metileno-butan-2-ona (5) .	88
5.3 Imobilização da BSA em nanopartículas magnéticas	89
5.4 Reações empregando o biocatalisador imobilizado	89
5.5 Planejamento Fatorial Completo (PFT)	90
Referências	92
Apêndice	99

Introdução

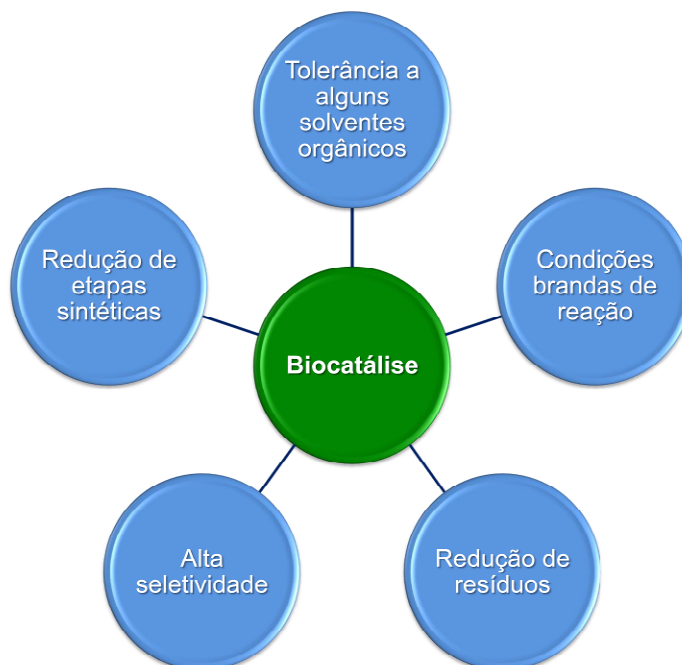
1 INTRODUÇÃO

1.1 Biocatálise: Aspectos gerais

A arte de fazer reações “impossíveis” utilizando os catalisadores mais poderosos da Terra - as enzimas - é conhecida como biocatálise.¹ Outra definição de biocatálise é descrita no periódico internacional Nature, como sendo um processo químico que utiliza enzimas ou outros catalisadores biológicos para mediar reações entre compostos orgânicos.²

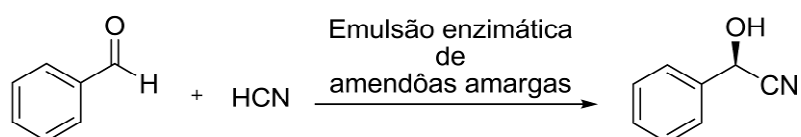
A utilização de biocatalisadores em sínteses orgânicas está se destacando cada vez mais. Os biocatalisadores podem ser utilizados na forma isolada ou como células íntegras em reações de sínteses orgânicas, especialmente para a conversão de substratos não naturais.³ Esta estratégia sintética iniciou-se quando os “12 Princípios da Química Verde” ainda não haviam sido estabelecidos, mas as preocupações em relação ao desenvolvimento de reações e processos químicos ambientalmente sustentáveis já estavam na agenda dos setores industrial e acadêmico.⁴

Atualmente a biocatálise é uma das principais “tecnologias verdes” adotada por indústrias farmacêuticas e de química fina para a manufatura de compostos químicos com alto valor agregado.⁵ Dentre as principais vantagens do emprego da biocatálise (Figura 1) em relação às estratégias sintéticas tradicionais estão: condições reacionais brandas (por exemplo, pH, pressão, temperatura), tolerância a meios aquosos/orgânicos para um vasto painel de biocatalisadores⁵, catalisadores quimio-, regio- e estereosseletivos, não há necessidade de etapas de proteção/desproteção de grupos funcionais, formação reduzida de subprodutos e conseqüentemente menor geração de resíduos.⁵⁻⁶

Figura 1 - Principais vantagens da Biocatálise.

Fonte: o autor

O desenvolvimento da biocatálise se iniciou há mais de um século atrás quando os cientistas da época reconheceram que os componentes dentro de uma célula viva poderiam ser aplicados para transformações químicas.³ Em 1913, Ludwig Rosenthaler iniciava os estudos de uma área denominada catálise assimétrica moderna mediada por enzima. Nestes primeiros estudos, foram avaliadas as reações entre o benzaldeído e o ácido cianídrico para a síntese da (*R*)-mandelonitrila catalisada por uma emulsão enzimática de amêndoas amargas (Esquema 1)⁷.

Esquema 1 - Síntese da (*R*)-mandelonitrila utilizando uma emulsão enzimática de amêndoas amargas.

Este período é conhecido como primeira onda da biocatálise. O principal desafio na época era a estabilidade limitada dos biocatalisadores em algumas condições experimentais. Mas tais deficiências foram superadas principalmente pelas técnicas de imobilização que, além de ajudar na instabilidade dos biocatalisadores, também facilitou a reutilização dos mesmos.³

A segunda onda da Biocatálise ocorre durante a década de 1980 e 1990, em que se iniciaram o uso das técnicas de engenharia de proteínas³, proporcionando grande avanço na área, facilitando principalmente a produção, isolamento e caracterização de enzimas provenientes de diversas fontes.⁸ Com isso, houve o aumento da gama de substratos que foram aplicados na síntese enzimática de intermediários farmacêuticos e de química fina. Por exemplo, a síntese de intermediários para herbicidas catalisados por hidroxinitrila liases⁹, a síntese de ésteres de cera catalisados por lipases para aplicação em cosméticos¹⁰ e na hidratação da acrilonitrila para acrilamida catalisada por nitrila hidratases na produção de polímeros (neste caso, a enzima foi empregada na forma de células inteiras de *Rhodococcus rhodochrous*)¹¹. Neste período, os novos desafios a serem superados eram a otimização do biocatalisador para os substratos não-naturais.³

A terceira onda da Biocatálise, teve início no final da década de 1990 através dos trabalhos de Pim Stemmer e Frances Arnold, com o desenvolvimento de uma estratégia denominada evolução dirigida e decorre até os dias atuais.¹² Esta tecnologia se tornou uma ferramenta fundamental em biocatálise, propiciando uma maneira eficiente de otimizar os biocatalisadores em função de suas propriedades catalíticas como, enantiosseletividade, maior estabilidade em processos químicos, aumento na resistência a solventes, alterações no pH e temperatura de trabalho.⁸

Durante a última década, a Biocatálise tem desempenhado um papel significativo na corrida para o desenvolvimento de novas reações catalíticas e na identificação de novas enzimas para aplicação em reações com fins sintéticos.⁷ Além disso, um novo termo denominado promiscuidade catalítica surgiu na biocatálise.⁶ Este termo consiste na possibilidade de um biocatalisador comum ou mutante catalisar diversas reações químicas. Esta habilidade tem atraído atenção de muitos químicos e bioquímicos, visto que estes biocatalisadores (desde proteínas isoladas

até células integras) são capazes de catalisar reações entre substratos não-naturais e catalisar diversas classes de reações.¹³

1.2 Promiscuidade catalítica

As enzimas são descritas como catalisadores específicos devido à presença de um sítio catalítico que promove a catálise das reações. Quando ocorre uma segunda atividade catalítica para o mesmo sítio ativo, é determinado o termo promiscuidade catalítica.

Na natureza, as enzimas se desenvolvem até um ponto em que sua atividade catalítica seja “suficientemente boa” para executar determinada função. Porém, através da evolução enzimática existem exceções importantes. O rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) evoluiu sob baixa pressão de oxigênio e é incapaz de distinguir entre o dióxido de carbono e o oxigênio. Com isso, ocorre uma reação de oxigenase produzindo subprodutos que a célula precisa lidar para sobreviver. Segundo Hult¹⁴, esse é um caso de promiscuidade natural utilizado nos casos em que a célula necessita sobreviver fora das condições ideais.¹⁴

A promiscuidade enzimática pode ocorrer de três formas:

- 1) Promiscuidade de condição: enzimas que apresentam atividade catalítica em variadas condições reacionais, por exemplo, pH e temperatura extremas.
- 2) Promiscuidade de substrato: enzimas que não apresentam especificidade de substrato.
- 3) Promiscuidade catalítica: enzimas que catalisam diferentes reações químicas. Neste caso, a promiscuidade pode ser dividida em dois grupos: acidental ou induzida. Na promiscuidade catalítica acidental, uma reação paralela é catalisada pela enzima natural. No caso da promiscuidade catalítica induzida, uma ou várias mutações reencaminham a reação catalisada por uma enzima natural.

Na Tabela 1 estão apresentados alguns exemplos de promiscuidade enzimática para as reações que formam uma nova ligação C-C.

Tabela 1 - Exemplos de promiscuidade enzimática.

Exemplo	Formas de promiscuidade			
	Condição	Substrato	Acidental	Induzida
Piruvato descarboxilase		x	x	
Lipase (reação aldólica)			x	x
Lipase (reação de Michael)			x	x
Lipase (resolução cinética de álcoois quirais)		x		
Lipase (transacilação em fase gasosa)	x			

Além da catálise enzimática pode haver a catálise proteica. A diferença entre esses dois tipos de catálise se baseia em que as enzimas possuem um sítio ativo para catalisar as reações (catálise enzimática). Enquanto na catálise proteica, estão envolvidos todos os resíduos de aminoácidos capazes de promover a catalise da reação, e não os aminoácidos presentes em um sítio catalítico propriamente dito.

Dessa forma, a catálise proteica também pode ser considerada como uma catálise promiscua.

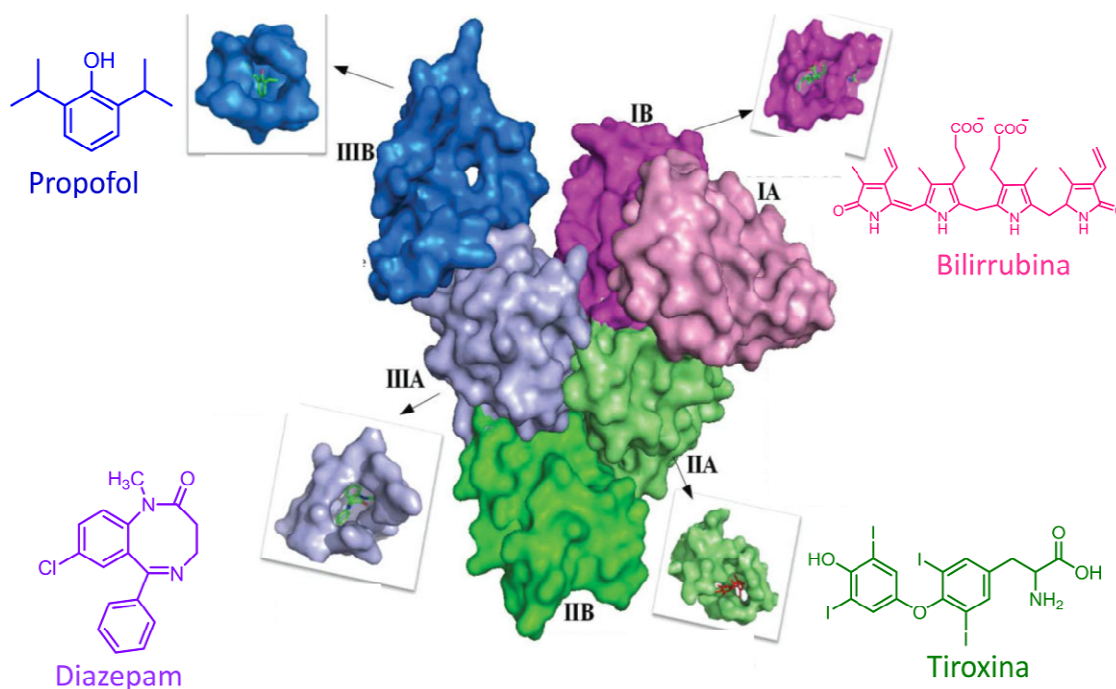
1.3 Soroalbuminas

As soroalbuminas/albuminas são as proteínas plasmáticas mais abundantes nos mamíferos. Seu nome é proveniente do alemão *albumen* que significa proteína, por sua vez, *albumen* é derivado do latim *albus* que significa branco.¹⁵ As albuminas podem ser provenientes de diversas fontes, sendo as mais estudadas a soroalbumina humana (HSA) e soroalbumina bovina (BSA).¹⁶

A albumina possui uma capacidade única de se ligar reversivelmente ou irreversivelmente, a um vasto número de diferentes substratos, tanto endógenos quanto exógenos exercendo um papel de proteína carreadora.¹⁷ A Figura 2 representa a estrutura cristalográfica da HSA, demonstrando a variedade de

substratos que podem interagir com esta proteína, bem como os sítios nos quais eles estarão ligados.

Figura 2 - Representação cristalográfica da soroalbumina humana (HSA).

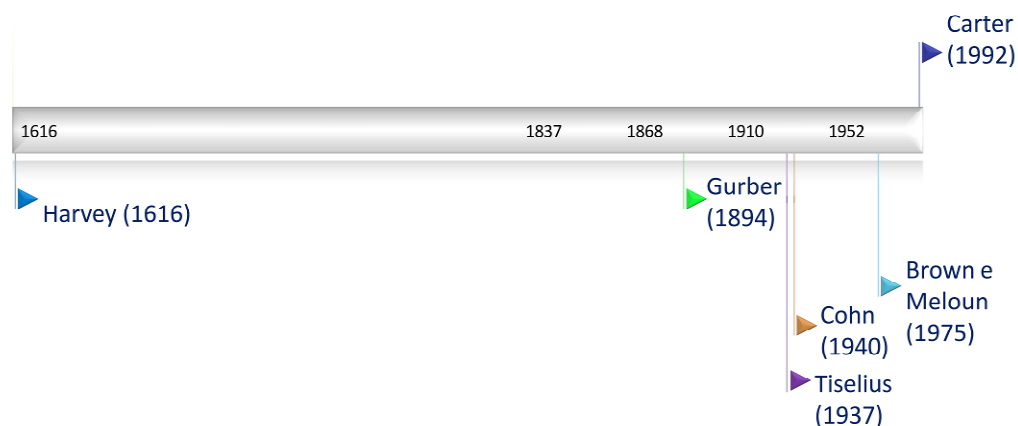


Fonte: adaptado de Varshney et al.¹⁷

A capacidade de se ligar a muitos substratos deve-se à adaptabilidade conformacional desta proteína, que se estende além dos sítios de interação através da cooperatividade e modulação alostérica entre os locais de ligação. A albumina possui forte carga negativa, se ligando de maneira fraca e reversivelmente com cátions. Por isso ela funciona tão bem como proteína carreadora para um grande número de moléculas incluindo ácidos graxos, íons, tiroxina, bilirrubina e aminoácidos.¹⁸ Esta proteína é capaz de reconhecer e ligar-se à uma série de compostos orgânicos, além disto, consegue discriminar os enantiômeros de uma molécula quiral e, por isso, vêm sendo utilizadas desde a década de oitenta como um agente de resolução cinética.¹⁶

Os estudos com a albumina se iniciaram no século XV e se estendem até os dias atuais (Figura 3).

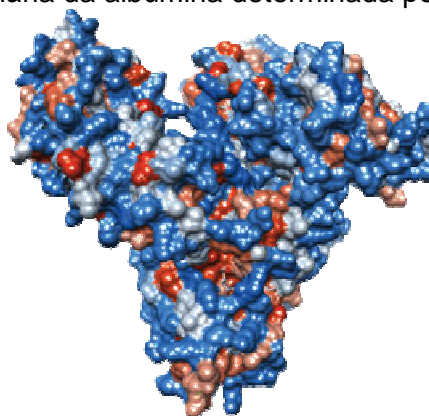
Figura 3 - Breve perspectiva histórica dos estudos com a albumina.



Fonte: o autor.

Em 1616 Harvey descreveu a circulação do sangue em suas palestras, então os cientistas da época reconheceram que no soro sanguíneo continha *albumen*, ou seja, continha proteína. Os pesquisadores do século XIX aprimoraram a técnica de cristalização, e a albumina foi uma das primeiras proteínas a serem cristalizadas. No ano de 1894, Guber obteve cristais de albumina extraída do soro sanguíneo de cavalos. Em 1937, Tiselius purificou e identificou a albumina como componente aniônico através de eletroforese. O maior desenvolvimento nos estudos com a albumina surgiu durante a Segunda Guerra Mundial, quando houve uma necessidade crítica de um substituto para o sangue que fosse estável suficiente para ser aplicado nos campos de batalha. Então, através da pesquisa desenvolvida por Cohn e seus colaboradores a albumina foi selecionada em 1940 pela Subcomissão de Transfusão de Sangue como sendo mais estável, menos antigênica, e menos viscosa que o plasma sanguíneo. A determinação da sequência de aminoácidos da albumina ocorreu em 1975 pelos pesquisadores Brown e Meloun, e por fim, no início da década de 1990, em 1992 Carter determinou a estrutura terciária da albumina através de raio-X (Figura 4).¹⁵

Figura 4 - Estrutura terciária da albumina determinada por Carter em 1992.



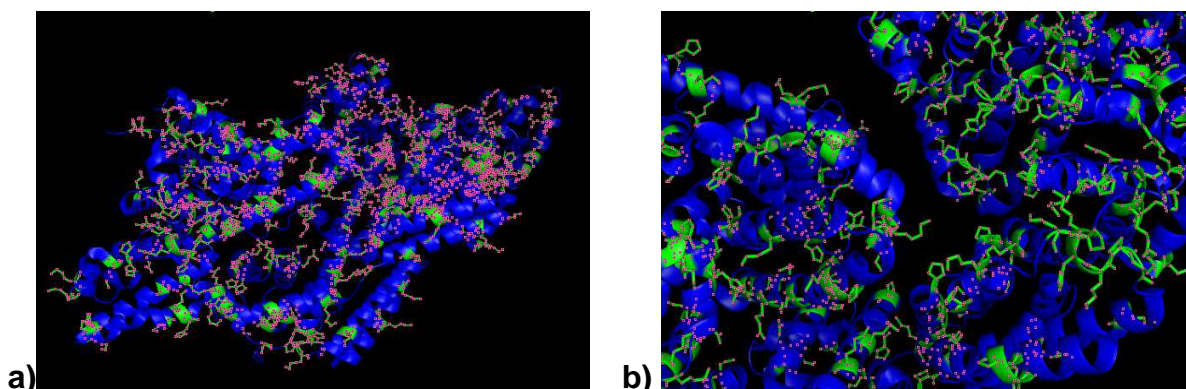
Fonte: Peters Jr.¹⁵

A BSA possui uma massa molecular de 66,5 KDa, não possui folhas β e um total de 583 resíduos de aminoácidos,¹⁵ sendo 127 resíduos com caráter básico que são responsáveis pela atividade catalítica desta proteína (Tabela 2).

Tabela 2 - Possíveis resíduos de aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica da BSA.

Aminoácido	Estrutura
Lisina	<chem>NC(CCC[NH2+])C(=O)O</chem>
Histidina	<chem>NC1=CN=C(N1)CC(=O)O</chem>
Prolina	<chem>C1CC[NH2+]C1C(=O)O</chem>
Arginina	<chem>NC(=N)NCCC[NH2+](C(=O)O)</chem>

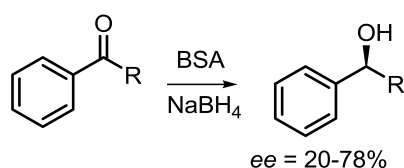
Figura 5 - Representação da estrutura secundária da BSA. a) Destaque para os resíduos de aminoácidos com caráter básico; b) Aproximação dos resíduos básicos.



Fonte: o autor

A primeira aplicação da BSA em síntese orgânica ocorreu por Sugimoto em 1978¹⁹, na redução enantiosseletiva de cetonas aromáticas (Esquema 2). Em alguns casos, a quantidade de proteína pode ser reduzida para níveis catalíticos aumentando grandemente a simplicidade do *work-up* e a eficiência da metodologia sem afetar a estereosseletividade.¹⁶

Esquema 2 - Exemplo primeira aplicação em síntese orgânica da BSA na redução de cetonas aromáticas.



A partir desta primeira aplicação da BSA, destacou-se que a albumina atua como catalisador em algumas reações orgânicas, embora não tenha um sítio catalítico (como nas enzimas). A ausência deste sítio catalítico faz da albumina um catalisador extremamente versátil, com uma ampla reatividade química que varia desde reduções e oxidações, a reações de cicloadição, e reações formadoras de uma nova ligação carbono-carbono.¹⁶ Porém, a falta de um sítio catalítico implica na baixa seletividade dessa proteína.

1.4 Imobilização de Biocatalisadores

Alguns biocatalisadores não são estáveis o suficiente em algumas condições operacionais, podendo perder atividade catalítica, e sofrer desnaturação com a utilização de alguns solventes orgânicos. Além disso, biocatalisadores são solúveis em água, o que dificulta sua recuperação bem como a separação dos substratos e produtos além de prejudicar operações unitárias pensando-se em uma escala industrial.²⁰

O termo “imobilização de biocatalisadores” se refere a biocatalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço.²¹ É desejável que haja retenção da atividade catalítica e a possibilidade de reuso dos mesmos que podem ser imobilizados através de processos reversíveis ou irreversíveis.

Dentre os processos irreversíveis, o encapsulamento e as ligações cruzadas, principalmente nas versões magnéticas, têm atraído atenção devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas, como super-paramagnetismo, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade.²²

1.4.1 *Cross-linking enzyme aggregates* (CLEA)

No início da década de 1960, estudos com proteína em fase sólida conduziram à descoberta de que cristais enzimáticos ou enzimas dissolvidas unidas por reações entre os resíduos de NH_2 promovidas por um agente bifuncional poderia formar o que é hoje conhecido como ligações cruzadas de cristais enzimáticos, ou, *cross-linking enzyme crystals* (CLEC).²³

Uma maneira mais simples, e também uma alternativa para a cristalização é a precipitação. Dessa forma surgiu o CLEA. Uma metodologia que envolve a agregação das proteínas, através da precipitação, seguida da formação de ligações cruzadas entre estes agregados utilizando-se agentes bifuncionais como o glutaraldeído (Figura 6).

A ligação cruzada envolve a reação entre os grupos de aminas primárias na

superfície do biocatalisador com o glutaraldeído, resultando na formação de uma base de Schiff reversível. Posteriormente, com a adição de um agente redutor como, por exemplo, borohidreto de sódio, a ligação cruzada torna-se irreversível (Esquema 3). Desde a etapa para a formação da ligação cruzada, a reação envolve os grupos NH_2 , provenientes dos resíduos de lisina presentes na superfície externa do biocatalisador.²⁰

Esquema 3 - Proposta mecanística para obtenção do CLEA.

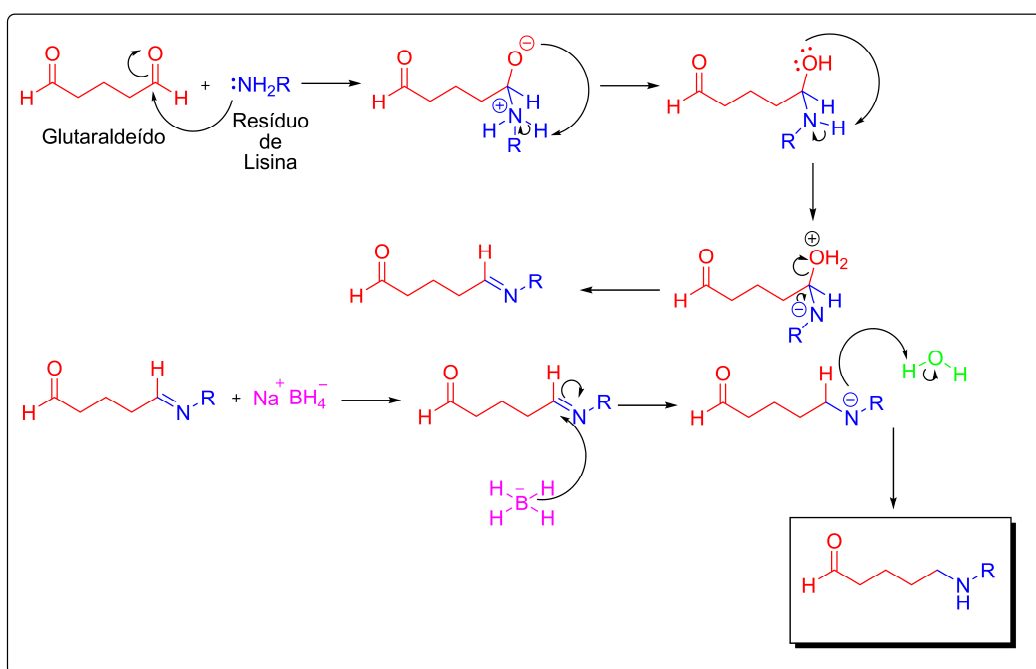
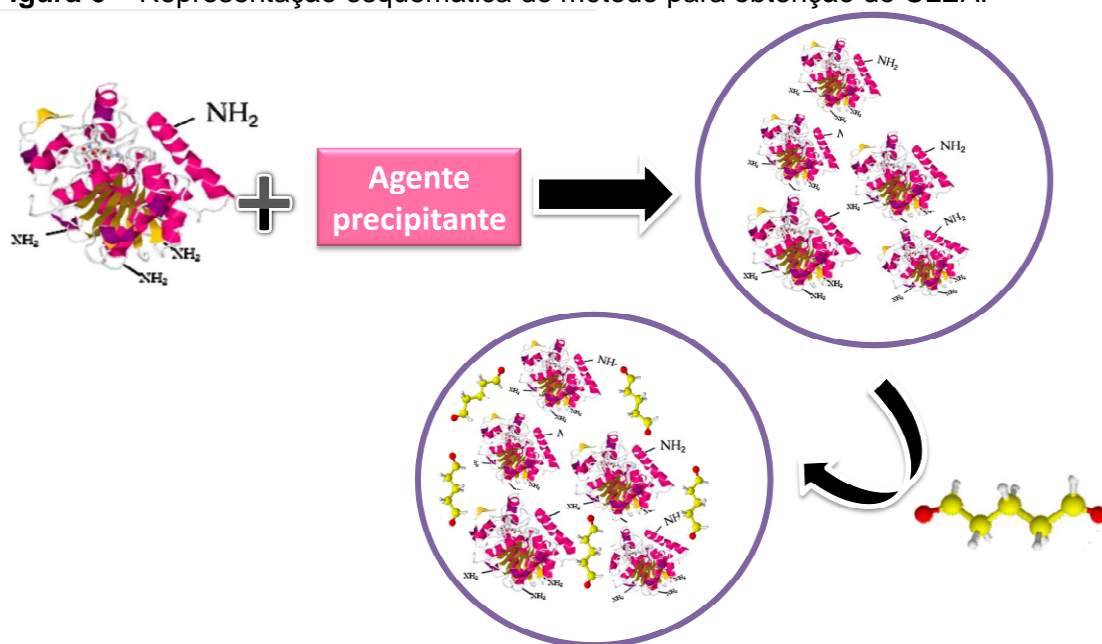


Figura 6 – Representação esquemática do método para obtenção do CLEA.



Fonte: adaptado de Torres et al.²⁴

Na maior parte dos casos há retenção total ou parcial da atividade catalítica, entretanto pode ocorrer a formação de suspensões estáveis que dificultam a recuperação e reuso do biocatalisador pelos métodos de separação tradicionais como filtração e centrifugação.²²

1.4.2 *Magnetic-Cross-linking enzyme aggregates* (M-CLEA)

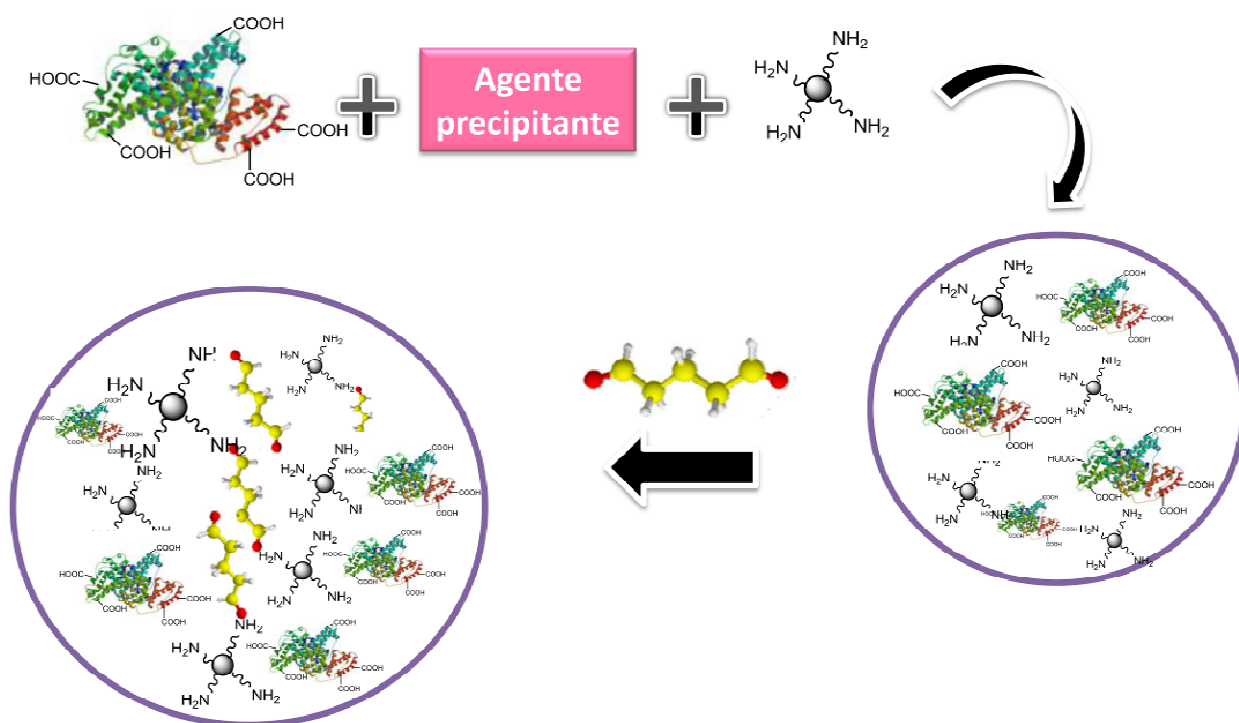
Para contornar os inconvenientes do CLEA uma estratégia utilizada é a magnetização dos agregados protéicos em nanopartículas superparamagnéticas. Neste caso o biocatalisador é separado do meio reacional quando um campo magnético externo é aplicado. Esta remoção é seletiva e eficaz em situações nas quais seria impossível ou impraticável de se conseguir utilizando outras técnicas de separação.²²

Os óxidos de ferro são compostos que podem ser sintetizados no laboratório e também estão espalhados pela natureza. São substâncias que estão presentes em diferentes compartimentos do sistema terrestre, como: atmosfera, biosfera,

hidrosfera e litosfera. Além disso, óxidos de ferro possuem aplicações interessantes como, por exemplo, na gravação magnética, na transformação de energia solar, eletrônica, na catálise e aplicações biomédicas.²⁵

No CLEA magnético (M-CLEA) desenvolvido durante esse trabalho, o precipitado formado ocorreu entre a proteína e uma nanopartícula magnética de óxido de ferro (Fe_3O_4) funcionalizada com amina primária proveniente de um organosilano, seguida da adição do agente reticulante (glutaraldeído) para a realização das ligações cruzadas entre as aminas da nanopartícula magnética. A proteína interage através de ligações de hidrogênio pelos resíduos de ácido carboxílico com os resíduos de amina da partícula magnética (Figura 7).

Figura 7- Representação esquemática para o preparo do M-CLEA.



Fonte: adaptado de Torres et al.²⁴

A partir dessa metodologia, o biocatalisador pode ser removido do meio reacional e reutilizado. A magnetização do CLEA permite também evitar inconvenientes que surgem durante processos de *work-up*, aumentando em alguns casos o rendimento da reação.

1.5 Reações orgânicas para a formação de ligação C-C catalisadas pela BSA

A formação de ligação carbono-carbono (C-C) é o coração da química orgânica sintética,²⁰ pois através da classe dessas reações torna-se possível sintetizar compostos complexos a partir de materiais de partida simples e menores.²⁷ Além disso, com a homologação de cadeias carbônicas pode-se gerar um ou mais centros de quiralidade. Os produtos resultantes destas reações podem ser utilizados como blocos construtores na síntese de moléculas de interesse comercial e/ou acadêmico.²⁷

Existem inúmeras metodologias sintéticas com esta finalidade, mas em geral requerem condições reacionais pouco sustentáveis do ponto de vista ambiental e até mesmo inviáveis operacionalmente se pensarmos em aumento de escala.²⁸⁻³¹ Já existe na literatura a descrição de reações biocatalisadas destas reações, porém os rendimentos são baixos e a seletividade e especificidade de substrato é limitada. Portanto, é necessário o desenvolvimento de metodologias mais robustas, eficientes e ambientalmente aceitáveis.

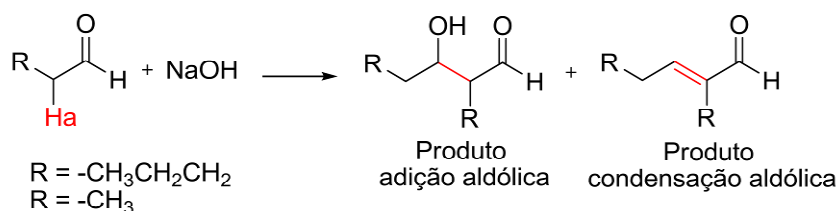
1.5.1 Reação Aldólica

A reação aldólica é uma das ferramentas mais poderosas em síntese orgânica para a formação de uma nova ligação C-C.³²

Aleksander Borodin em 1864, na tentativa de obter pentanoato de sódio, reagiu pentanal com hidróxido de sódio. Após o tratamento com água Borodin obteve uma mistura complexa em que um dos produtos obtidos parecia ser o resultado da condensação entre as duas moléculas de pentanal, com a eliminação de uma molécula de água.³³ Ao realizar a mesma reação, porém com o etanal, o

pesquisador obteve um produto que continha duas funções orgânicas: álcool e aldeído (Esquema 4).

Esquema 4 - Reação aldólica: Produtos de adição e condensação.

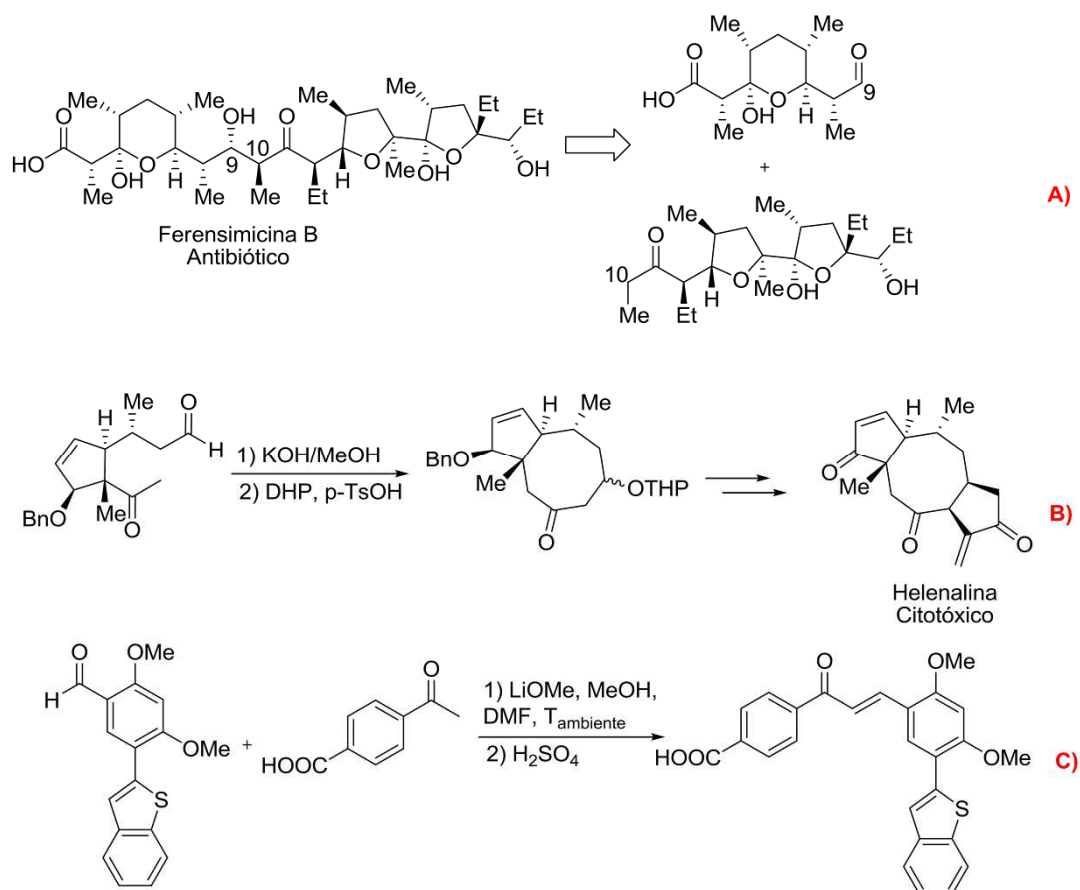


Fonte: adaptado de Filgueiras.³²

Posteriormente, o pesquisador alemão Charles Adolphe Wurtz empregou o termo aldol representando a bifuncionalidade do produto obtido: ald (de aldeído) e ol (do álcool).³³ Assim, a adição aldólica inicialmente ficou determinada como sendo a reação entre dois aldeídos com hidrogênios enolizáveis na posição α à carbonila.³⁴ Porém, pelos estudos de Borodin, constatou-se que sob aquecimento o aduto aldol sofria a eliminação de uma molécula de água fornecendo um produto α - β -insaturado. Essa condensação seguida da eliminação da água é denominada condensação aldólica.³²

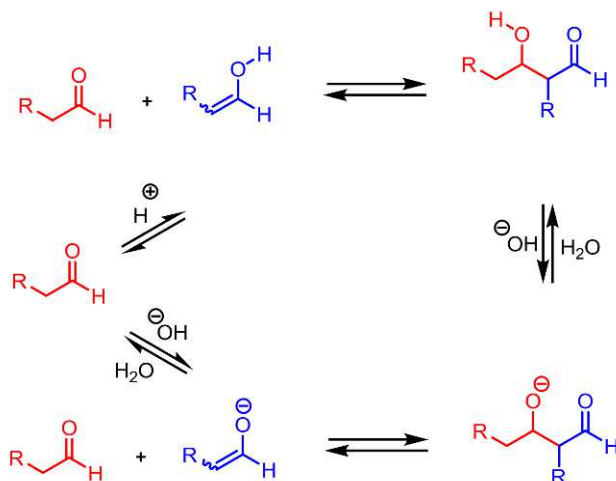
De uma forma geral a reação aldólica pode ser descrita como uma adição nucleofílica de um enol a um aldeído para a formação de produtos β -hidróxi-carbônicos^{35,36} que são substâncias encontradas frequentemente em muitos compostos biologicamente ativos (Figura 8).³⁷⁻³⁹

Figura 8 - Exemplos de compostos bioativos sintetizados através da reação aldólica.



Fonte: o autor.

Tradicionalmente, a reação aldólica ocorre com a mistura de duas substâncias carbonílicas diferentes (reação aldólica cruzada) e acreditava-se que a catálise dessa reação era mediada por bases³⁴. Entretanto observou-se que a catálise ácida também pode ser efetiva. No Esquema 5 estão representadas as duas propostas para catálise das reações aldólicas.³²

Esquema 5 – Reações aldólicas catalisadas por ácidos e bases.

Na catálise básica, a acidez dos hidrogênios α à carbonila favorece a abstração do próton pela base fornecendo o enolato que é estabilizado por ressonância.⁴⁰ A etapa seguinte, consiste na adição nucleofílica do enolato à outra substância carbonilada gerando um intermediário alcóxido que, sofrerá protonação fornecendo o β -hidróxialdeído. Já na catálise ácida, a essência está na protonação do oxigênio, deixando o carbono mais eletrofílico para sofrer o ataque do enol proveniente do tautomerismo cetoenólico.⁴¹

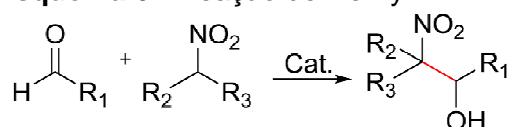
Para tornar a reação aldólica mais interessante deve-se ter controle sobre os reagentes: qual dos compostos carbonílicos agirá como eletrófilo e qual formará o enolato, e qual será a estereoquímica do enolato visando a formação de um produto quiral.⁴²

No primeiro caso, um meio de evitar a auto-condensação é a utilização de uma cetona enolizável e um aldeído não enolizável.⁴³ Para o controle da estereoquímica do enolato podem ser utilizados biocatalisadores, visto que eles possuem certa seletividade^{35,36}, e auxiliares quirais que estarão ligados covalentemente ao enolato⁴². Estas metodologias podem levar a excelentes níveis de estereosseletividade nas reações aldólicas assimétricas.

1.5.2 Reação de Henry (Nitroaldol)

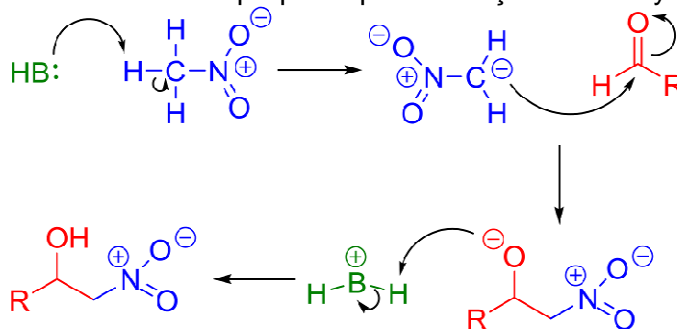
A reação de Henry (nitroaldol) é outra reação clássica em síntese orgânica para a formação de ligação C-C.⁴⁴ A formação de nitroálcoois vicinais através do acoplamento entre um composto carbonílico e um nitroalcano (Esquema 6), foi descoberta por Henry em 1895.⁴⁵

Esquema 6 - Reação de Henry.



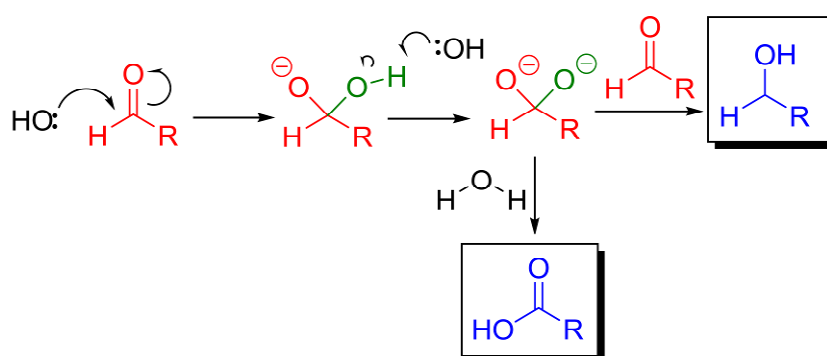
As reações nitroaldólicas podem ser catalisadas por diferentes tipos de catalisadores e condições experimentais. São empregados bases orgânicas e inorgânicas como catalisadores, enquanto as condições da reação podem ocorrer sem a presença de solvente ou com solventes próticos e apróticos.^{44,46} Os métodos clássicos para a síntese dos β -nitroálcoois envolvem a catálise com bases fortes (Esquema 7) como hidróxidos, carbonatos, alcóxidos, acetato de amônio, fluoreto de potássio e aminas.⁴⁷ Entretanto, deve-se ter grande controle em relação à quantidade de base adicionada visto que catalisadores básicos são bons catalisadores para as reações de Cannizzaro (Esquema 8), bem como a reação aldólica.⁴⁴ Além disso, os β -nitroálcoois podem sofrer eliminação de água fornecendo nitroalcenos que polimerizam facilmente.⁴⁴

Esquema 7 - Mecanismo proposto para a reação de Henry.



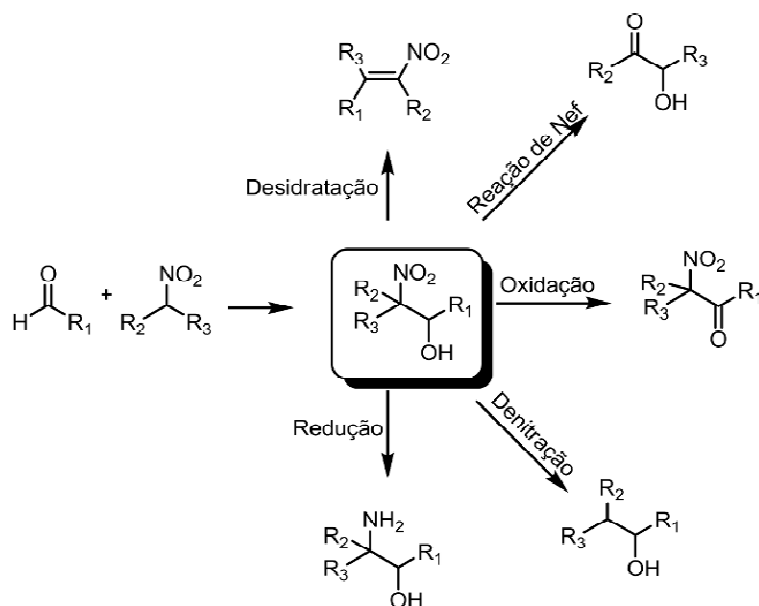
Fica evidente que o mecanismo da reação de Henry é derivado da reação aldólica, em que, a primeira etapa é a desprotonação do nitroalcano gerando um carbânion que é estabilizado por ressonância. O carbânion atua como nucleófilo atacando o componente carbonílico com a formação do alcóxido que posteriormente é protonado fornecendo o β -nitroalcool.⁴⁵

Esquema 8- Mecanismo proposto para a reação de Cannizzaro.

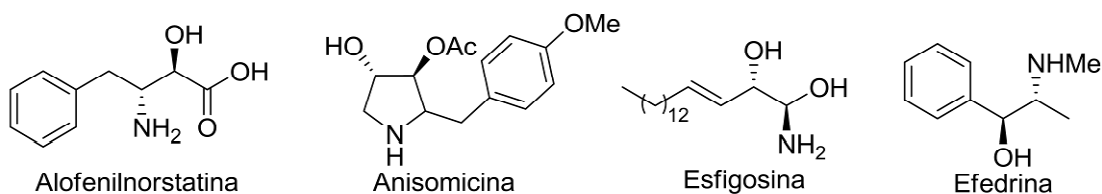


Quando não há o controle da quantidade de base adicionada, ocorrerá o ataque da base no carbono mais eletrofílico, que possibilitará a formação de dois produtos: um álcool, e um álcool carboxílico.

Porém, quando o β -nitroálcool é sintetizado com sucesso, estes compostos são capazes de sofrer inúmeras transformações químicas (Esquema 9) que dão origem a intermediários extremamente úteis para a síntese de compostos bioativos como por exemplo, a esfingosina e efedrina (Figura 9).⁴⁶

Esquema 9 - Utilidade sintética da reação de Henry.

Já existem na literatura diversas metodologias para a reação de Henry, porém o controle da estereoquímica dessa reação continua sendo um desafio para os químicos orgânicos.⁴⁸

Figura 9 - Exemplos de fármacos a partir de intermediários β-nitroalcoólicos.

Fonte: Adaptado de Luzzio, 2001.⁴⁵

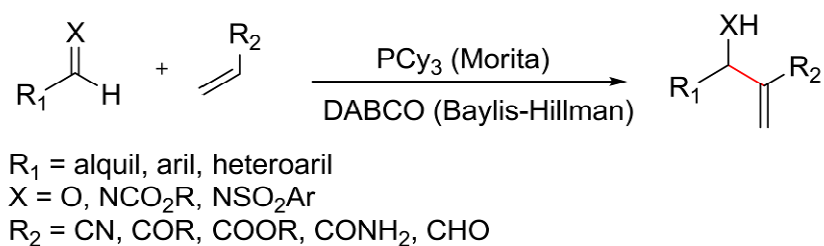
1.5.3 Reação de Morita-Baylis-Hillman

Outra reação para a formação de uma nova ligação C-C é a reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH).¹³ Inicialmente, a reação de MBH foi estudada por Morita⁴⁹ e posteriormente por Baylis e Hillman⁵⁰.

De modo geral a reação de MBH pode ser definida como a condensação de

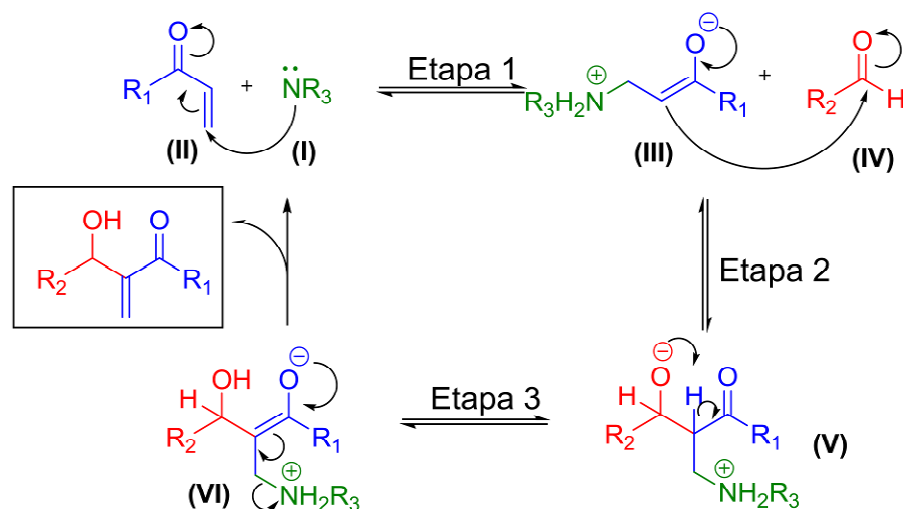
um carbono eletrofílico sp^2 , tipicamente de aldeídos, e a posição α de uma olefina contendo um grupo retirador de elétrons, catalisada por uma amina terciária ou fosfina (Esquema 10).

Esquema 10 - Reação de Morita-Baylis-Hillman.



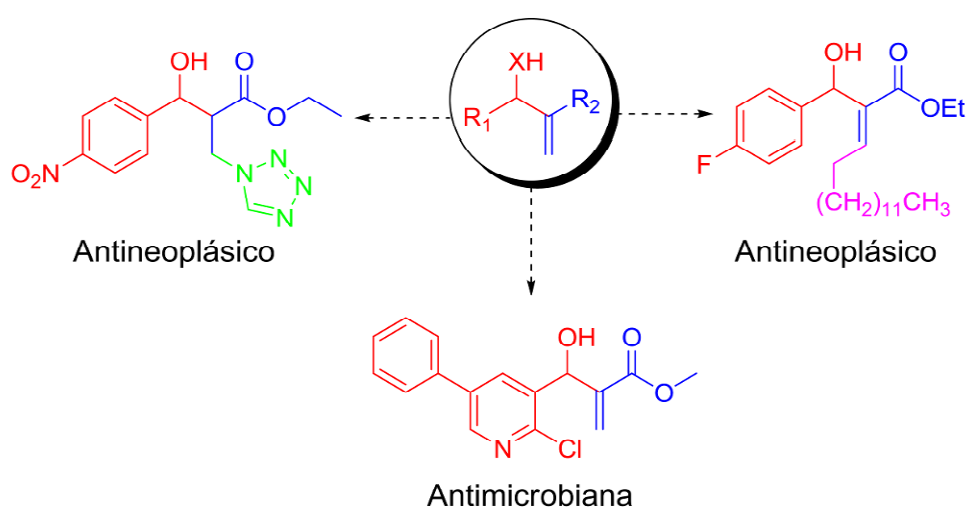
A primeira etapa do mecanismo dessa reação (Esquema 11), considerada a etapa determinante, é a adição de Michael da amina (I) ao sistema α,β -insaturado (II) levando ao azaenolato zwitteriônico (III). Subsequentemente, uma adição aldólica envolvendo o azaenolato (III) e o aldeído (IV) produz o zwitterion (V) que após migração interna do próton e eliminação do catalisador fornece o produto β -hidroxi- α -metileno carbonilado (VII) (aduto de MBH).

Esquema 11 - Mecanismo proposto para a reação de MBH.



Os adutos de MBH possuem grande aplicabilidade em síntese orgânica, pois são altamente α,β funcionalizados capazes de gerar dois centros quirais que podem ser utilizados como intermediários sintéticos na produção de compostos bioativos como antimicrobianos, antineoplásicos, antifúngicos, hipolipidêmicos e leishmanicidas (Figura 10).⁵¹

Figura 10 - Exemplos de compostos bioativos sintetizados a partir de adutos de MBH.



Fonte: O autor.

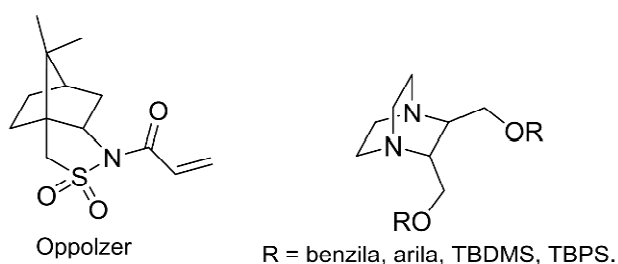
A reação de MBH apresenta características interessantes que estimulam a exploração de seu potencial sintético, como: ser quimio- e regiosseletiva com a formação de um novo centro assimétrico, a polifuncionalização dos adutos que são preparados em condições reacionais brandas (sem tratamento de solvente e sem a necessidade de trabalhar em uma atmosfera inerte), ser muito eficiente em relação à economia de átomos, visto que todos os átomos presentes no material de partida são incorporado no produto final.⁵²

A importância de sintetizar compostos enantiomericamente puros é cada vez maior na indústria de química fina, farmacêutica e alimentícia tendo em vista que nos dias atuais temos pleno conhecimento sobre a importância da quiralidade relacionada à atividade e propriedade dos compostos. Porém, o desenvolvimento de

novas metodologias de obtenção de moléculas quirais ainda é um desafio para a química orgânica.⁵²

A versão assimétrica da reação de MBH apresenta um ponto crítico, que é exatamente a obtenção do aduto enantiomericamente enriquecido em rendimentos químicos satisfatórios. As estratégias utilizadas até então se baseiam no emprego de auxiliares quirais (Figura 11), porém deve-se investir na pesquisa de novos auxiliares quirais para esta reação, bem como na busca de novos catalisadores, que possam levar à obtenção de adutos com alto grau de pureza enantiomérica.⁵²

Figura 11 - Auxiliares quirais utilizados na reação de MBH.

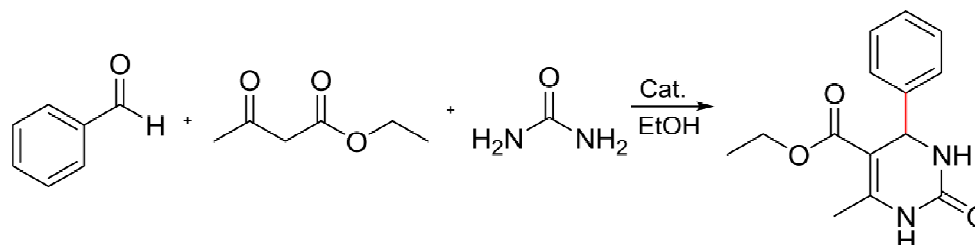


1.5.4 Reação de Biginelli

Reações multicomponentes (MCRs), são transformações químicas em que três ou mais reagentes são incorporados no produto final desejado. Estas reações são realizadas em um procedimento conhecido como *one-pot*, em que todos os componentes da reação são adicionados ao mesmo meio reacional⁵³. As MCRs possuem grande vantagens em relação as rotas sintéticas tradicionais, visto que, apresentam alta economia de átomos, elevada eficiência e produtividade, alta convergência, boa relação custo/benefício e fácil operação.⁵⁴

A reação de Biginelli, descoberta por Pietro Biginelli em 1893⁵⁵, é uma condensação tricomponente envolvendo um aldeído, uréia ou tiouréia e um β -cetoéster formando como produto 3,4-diidropirimidin-2(1H)-ona (DHPM) (Esquema 12). Inicialmente a síntese dessas substâncias eram realizadas utilizando ácidos fortes como catalisadores sob condições de refluxo.⁵⁴

Esquema 12 - Reação de Biginelli.

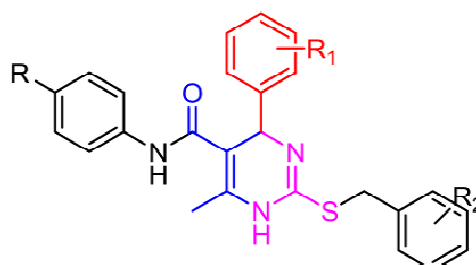


Por serem compostos com grande importância biológica, novas propostas e metodologias foram estudadas com a intenção de compreender como os materiais de partida interagem entre si.⁵⁶ Dessa forma, surgiram algumas propostas mecanísticas. Atualmente existem três propostas mais aceitas (Esquema 13): mecanismo via Knoevenagel, mecanismo via imínio e mecanismo via enamina.⁵⁷

A reação de Biginelli despertou grande interesse por ser um método conveniente para a síntese de DHPMs, substâncias que pertencem a uma importante classe de compostos bioativos devido as suas propriedades terapêuticas⁵⁸. As DHPMs possuem um grande espectro de atividades farmacológicas, tais como, antivirais, antiinflamatórias, antibacterianas e anticarcinogênicas.⁵⁹

O composto **4** é um bloco construtor para a síntese de fármacos anti-hipertensivos (Figura 12).

Figura 12 - Fármaco anti-hipertensivo que utiliza o composto **4** como bloco construtor.



R: F, Br, NO₂

R₁: 2,4 Cl, 4-Br, 3-NO₂, 4-NO₂, 3,4-OCH₃, 4-OCH₃

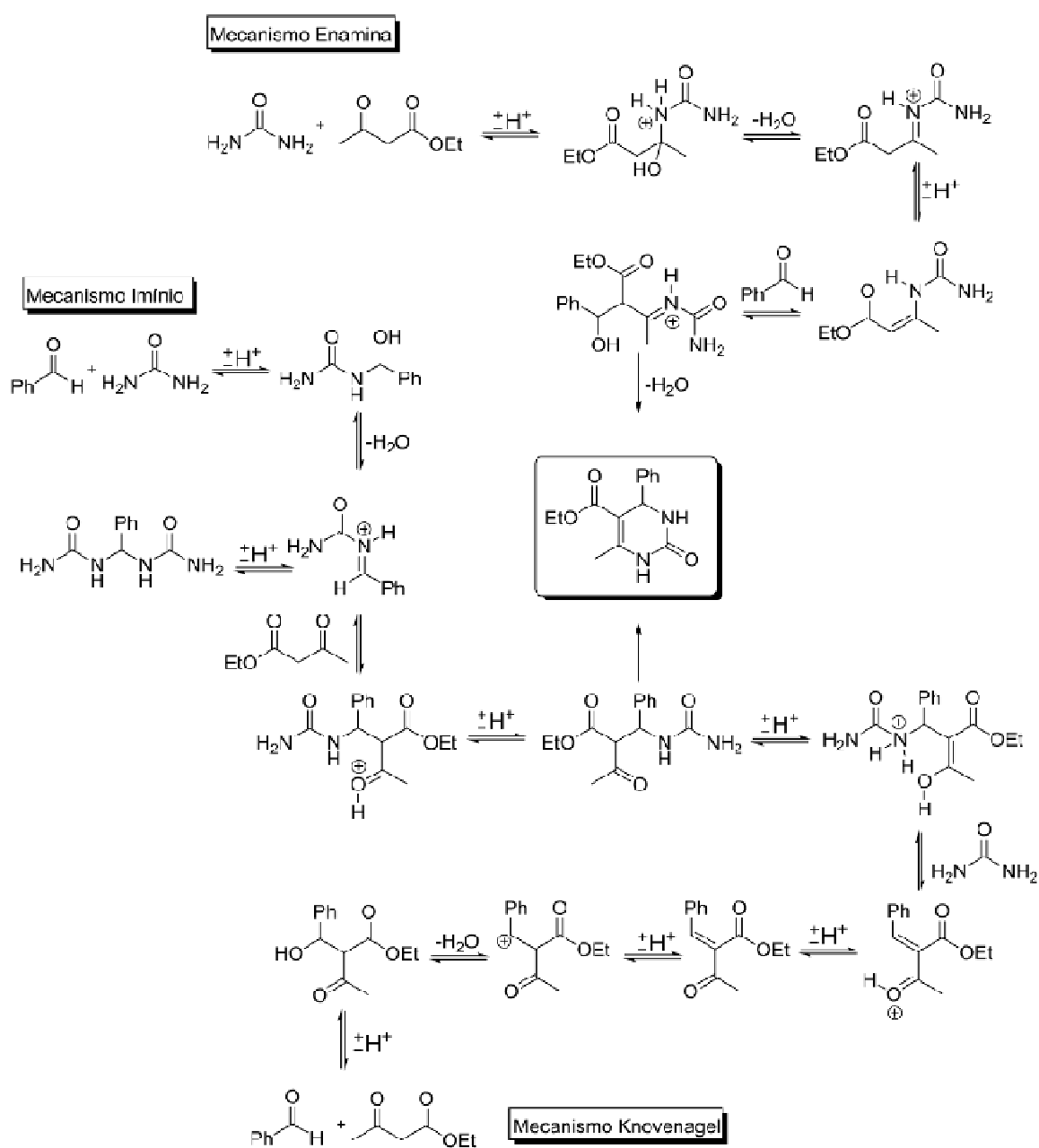
R₂: H, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 4-F

Fonte: adaptado de Sandhu.⁵⁹

Os derivados das reações de Biginelli são alvos atrativos devido a suas

atividades biológicas. Porém, as sínteses clássicas destes compostos, além de serem realizadas em condições severas apresentam baixos rendimentos. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas metodologias acessíveis para a síntese destes compostos.

Esquema 13 - Mecanismos aceitos para a síntese de DHPMs.



1.6 Engenharia do Meio Reacional e Planejamento Fatorial Completo

Os processos laboratoriais, durante ou após seu desenvolvimento, passam por um processo de otimização. Tais procedimentos visam melhorar algum tipo de resultado/resposta que seja de interesse do pesquisador, estudando as diferentes variáveis que influenciam um sistema e alteram sua resposta.⁶⁰

Há duas maneiras de seguir com uma otimização, uma delas é variar um fator de cada vez mantendo os outros fixos, porém essa metodologia é menos eficiente. A segunda estratégia para otimizar os resultados, é o método multifatorial onde todas as variáveis são estudadas simultaneamente, permitindo uma melhor análise de como todas as variáveis influenciam o sistema como um todo.⁶¹

As variáveis de resposta a serem escolhidas variam conforme cada sistema, elas podem ser: rendimento, seletividade, precisão, etc. Para as variáveis independentes, ou seja aquelas que serão estudadas para avaliar a resposta, o pesquisador possui a liberdade de variar os níveis com o objetivo de otimizar sua resposta.

A utilização de métodos quimiométricos para o aprimoramento dos resultados em química orgânica auxilia na visualização da influência de cada variável em um meio reacional de forma simultânea. Neste trabalho, os experimentos que serão planejados levarão em conta simultaneamente as condições reacionais do sistema.

O planejamento fatorial completo é amplamente utilizado em química analítica, mas a aplicação desse tipo de metodologia também pode ser estendida para a otimização de parâmetros como rendimento e seletividade em síntese orgânica.

Neste trabalho, para a engenharia do meio reacional foram avaliadas três variáveis: temperatura, concentração do biocatalisador e condição do catalisador (imobilizado ou livre). Em um primeiro momento, foram realizados experimentos a fim de verificar as variáveis mais influentes no sistema. Posteriormente, com a definição da variável mais influente na resposta realizamos um estudo de ascendência a fim de obtermos condições otimizadas.

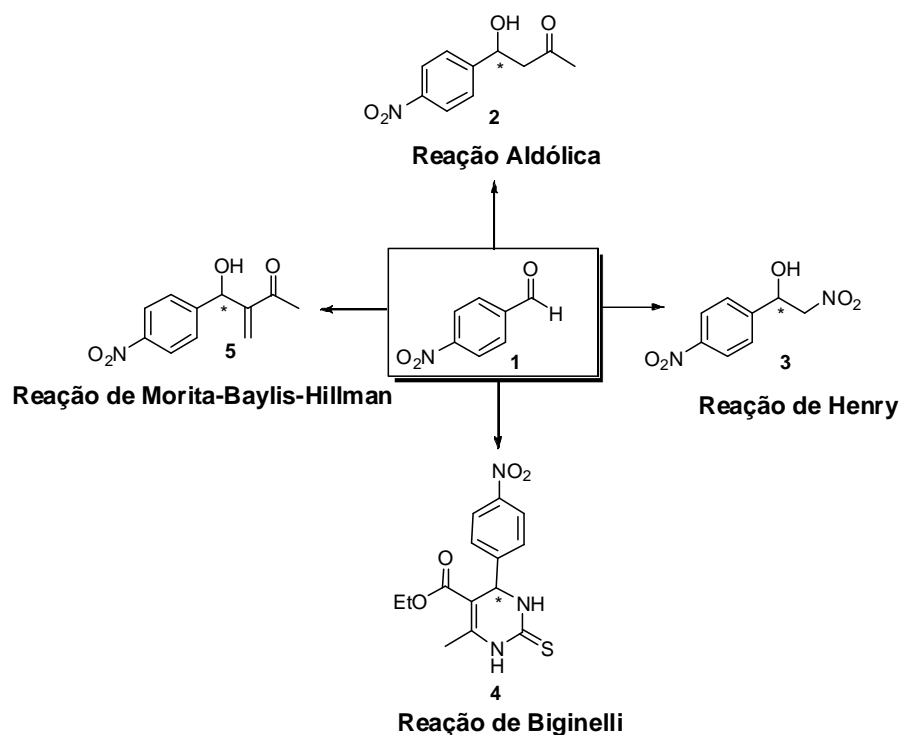
Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a promiscuidade catalítica da BSA em reações de formação de ligações C-C em sínteses orgânicas (Esquema 14).

Esquema 14 - Moléculas alvo pretendidas.



2.2 Objetivos Específicos

- I. Sintetizar e caracterizar os compostos **2**, **3**, **4** e **5**;
- II. Avaliar a capacidade catalítica da BSA frente as quatro reações de formação de ligação C-C;
- III. Avaliar a enantiosseletividade da BSA na síntese de **2**, **3**, **4** e **5**;
- IV. Imobilizar o biocatalisador em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro visando o controle da seletividade e a reutilização do mesmo;

- V. Otimizar as condições reacionais para a reação mais promissora, controlando variáveis como temperatura, uso de solventes, concentração de catalisador, tempo de reação e imobilização. Utilizando como estratégia principal o planejamento fatorial completo.
-

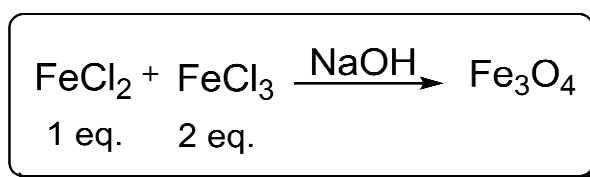
Resultados
e
Discussão

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Imobilização da BSA em Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro

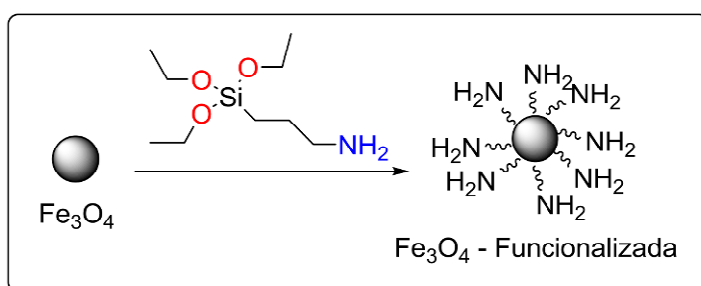
Realizou-se a síntese de nanopartículas de óxido de ferro a partir de uma solução de cloreto de ferro (II) e cloreto de ferro (III). Ambas soluções foram misturadas em um reator ultrassônico contendo hidróxido de sódio. Este método para a síntese das nanopartículas baseou-se nos estudos realizados por Kopp et al (Esquema 15)²².

Esquema 15 - Síntese das nanopartículas de óxido de ferro.

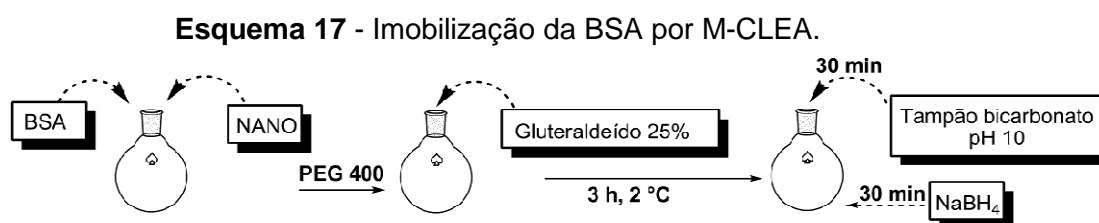


Em seguida a superfície da nanopartícula recém preparada foi funcionalizada com aminas. Dessa forma, os resíduos de amina incorporados na nanopartícula formariam ligações cruzadas entre si. Para a funcionalização das nanopartículas utilizou-se um organossilano com uma amina primária presente em sua cadeia lateral, o (3-aminopropil)trietóxisilano (APTES) (Esquema 16).

Esquema 16 - Funcionalização das nanopartículas utilizando o APTES.

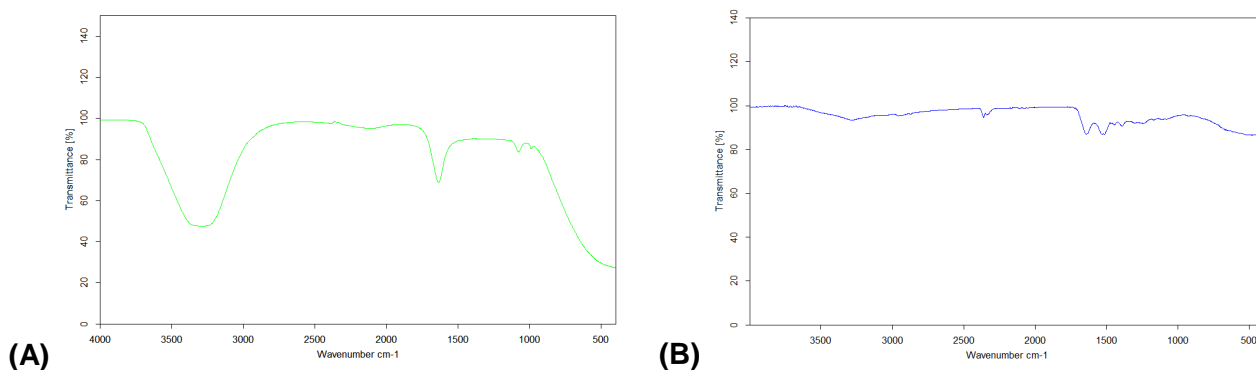


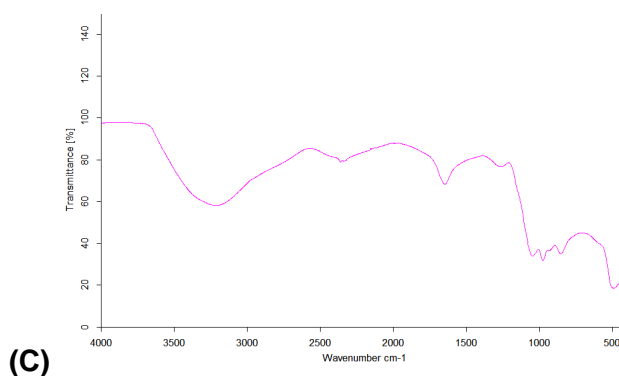
A etapa seguinte consistiu na imobilização da BSA por M-CLEA. Em um reator encamisado foram adicionados, 40 mg de nanopartícula e uma solução de BSA com concentração 4 mg.mL^{-1} . A proteína foi precipitada utilizando polietilenoglicol (PEG) 400, seguida da adição de glutaraldeído para a formação das ligações cruzadas (Esquema 17).



Retirou-se o biocatalisador com a aplicação de um campo magnético externo e o mesmo foi lavado diversas vezes com água destilada. Sendo assim, a caracterização inicial da imobilização foi realizada por espectroscopia no infravermelho (Figura 13).

Figura 13 - Espectros no infravermelho pelo modo ATR: a) Nanopartícula magnética; b) BSA; c) BSA imobilizada nas nanopartículas magnéticas.

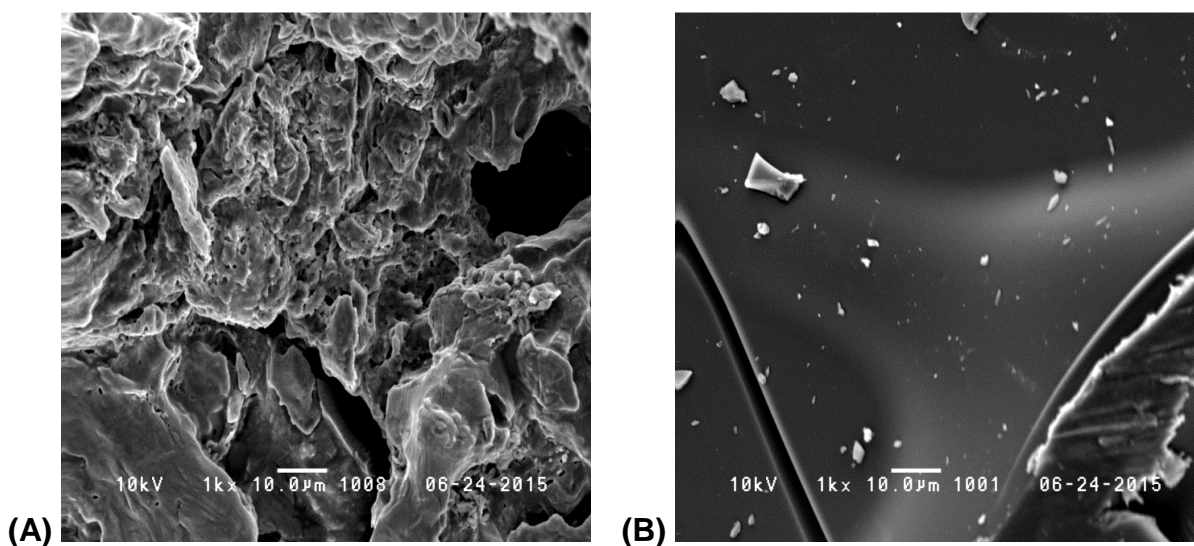


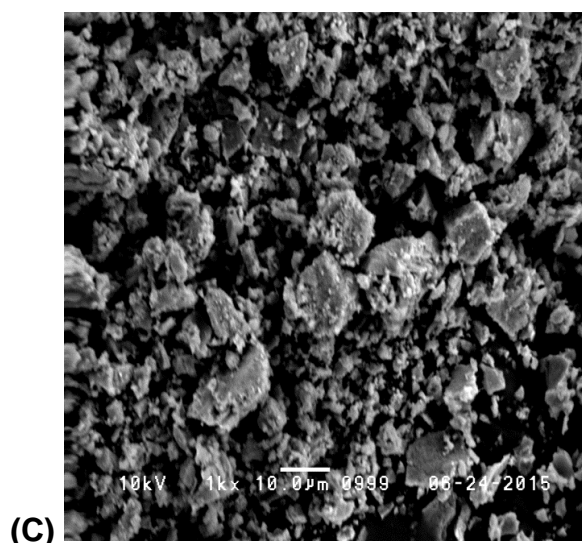


Fonte: o autor.

Porém, somente estes dados não foram conclusivos para afirmar a efetiva imobilização da BSA. Sendo assim, realizamos fotos de microscopia eletrônica de varredura para observar a formação dos agregados entre a nanopartícula e a proteína (Figura 14).

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura para BSA imobilizada. a) Nanopartícula Magnética; b) BSA; c) BSA imobilizada





Fonte: o autor.

Na foto em (c) é possível observar as mudanças morfológicas que ocorreram entre as microscopias (a) e (b), com a formação dos agregados entre a nanopartícula magnética e a proteína, confirmando a imobilização efetiva da BSA.

Diante destes resultados, empregou-se a BSA de duas maneiras nas quatro reações a serem estudadas. Na forma livre, e utilizando a técnica de imobilização do tipo M-CLEA. Dessa forma, serão apresentados os resultados para as quatro reações que foram estudadas.

3.2 Reação Aldólica

Tendo em vista o potencial sintético das reações aldólicas, uma das propostas do trabalho, foi sintetizar o composto **2**. Esse produto pode ser utilizado como bloco construtor para inúmeras moléculas. Sua síntese foi realizada utilizando a BSA como catalisador (Esquema 18), e a prolina nas mesmas condições reacionais para fins de comparação dos resultados (Tabela 3).

Esquema 18 - Reação aldólica reproduzida para a síntese de **2** utilizando a BSA livre ou imobilizada.

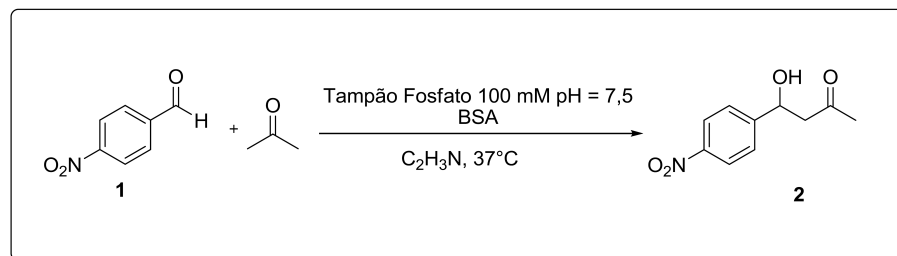


Tabela 3 - Resultados obtidos para a síntese de **2**.

Entrada	Catalisador	Conversão %	ee %
1	BSA livre	33,5	10
2	BSA imobilizada	29,1	5
3	Prolina	30,0	n.d.*
4	Nanopartícula	0	n.d.
5	-	0	n.d.
6	BSA literatura ⁶⁴	80,0	n.d.

Tempo reacional de 30 horas.

1 mmol de 1:0,2 μmol de BSA

*n.d. – não determinado

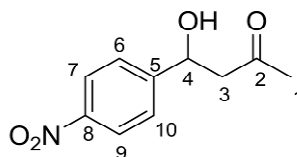
Foram obtidos bons resultados durante a síntese de **2** utilizando BSA livre e imobilizada. Pois, nas reações aldólicas com a utilização de outros catalisadores, são observados alguns inconvenientes. É bem comum observar a formação do produto de condensação aldólica, que são formados a partir da desidratação do aduto de aldol.⁶²

Os resultados de excesso enantiomérico foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplado com um detector de dicroísmo circular para identificação dos compostos quirais.

Através das entradas 1 e 5, comprova-se a atividade catalítica da BSA na reação aldólica. A conversão para a reação aldólica utilizando a BSA livre foi de 33,5%. Pensando em aprimorar esse resultado, a BSA imobilizada foi empregada na

reação e a conversão obtida de 29,1%. Apesar da pequena diminuição da conversão bem como no excesso enantiomérico na síntese de **2**, o uso da BSA imobilizada na reação aldólica traz vantagens para as operações de extração líquido-líquido, sem a formação de emulsão que prejudicam a extração. A reação aldólica também foi realizada utilizando a prolina (entrada 3). Observamos que em um mesmo período de tempo há uma maior conversão em produto quando utilizada a BSA, evidenciando o potencial biocatalítico desta proteína visto que a prolina é um potente organocatalisador. Visto que a nanopartícula magnética estava funcionalizada com APTES, realizamos a reação aldólica apenas com a nanopartícula para eliminar a possibilidade de uma catálise metálica ou uma catálise promovida pelo organosilano (entrada 4). Como já esperado não houve formação de produto, comprovando a catálise pela BSA quando ela foi empregada na condição imobilizada. Comparando os resultados aqui obtidos com a literatura⁶⁴, verificamos que houve a diminuição na conversão do produto desejado. A BSA obtida comercialmente possui diferentes graus de purificação de acordo com cada fornecedor. Dessa forma, os lotes de BSA utilizados entre os resultados da literatura e os obtidos nessa dissertação, podem interferir nos resultados de conversão explicando a diferença nos dados de conversão.

Após interromper a reação não foram observados a formação de outros produtos por CCD. Como os Rfs do material de partida bem como do produto eram 0,6 e 0,2, respectivamente, para o sistema hexano:acetato de etila (1:1). Optou-se pela purificação por CCDP. Posteriormente, à recuperação do produto **2** foi de 10%, e confirmou-se a síntese do produto desejado através da caracterização do composto por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (Tabela 4).

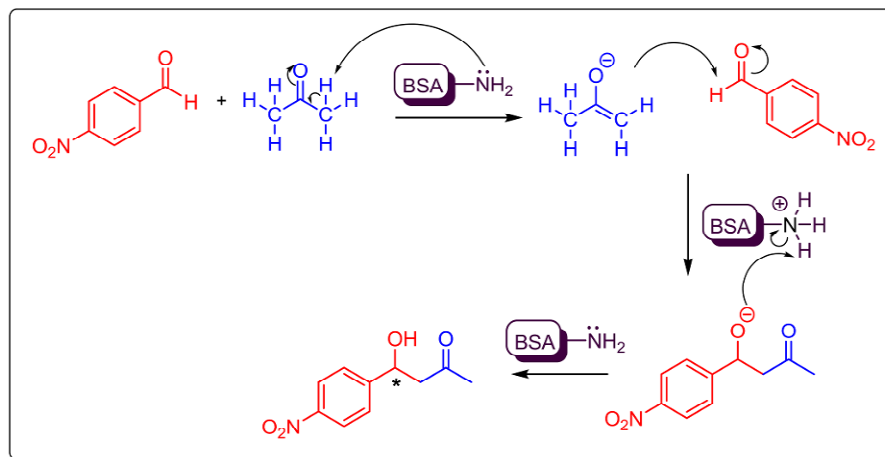
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H para o composto **2** (CDCl_3 , 300,19).

Dados Experimentais					Literatura ⁶⁴			
H	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)
1	2,22	s	3	-	2,11	s	3	-
3	2,88	m	2	-	2,84	m	2	-
4	5,26	dd	1	7,7/4,5	5,26	m	1	-
6 e 10	7,58	m	2	-	7,53	d	2	8,8
7 e 9	8,26	m	2	-	8,20	d	2	8,8

No espectro de RMN de ^1H de **2** observa-se o simpleto a 2,22 ppm integrando para três hidrogênios, correspondente aos três hidrogênios da metila (C-1). O duplo duplete em 5,26 ppm integrado para um hidrogênio, refere-se ao hidrogênio do C-4. O multiplete observado em 2,88 ppm, refere-se aos dois hidrogênios diastereotópicos de C-3. Os dupletos com deslocamento químico em 7,58 e 8,26 ppm são referentes aos hidrogênios correspondentes ao anel aromático.

A proposta mecanística utilizando a BSA como catalisador para a formação de **2** está apresentada no Esquema 19. A primeira etapa do mecanismo consiste na formação da cetona enolólica a partir da abstração do hidrogênio ácido da acetona pelos resíduos básicos da BSA. Em seguida ocorre o ataque nucleofílico do enolato na carbonila do aldeído, levando à formação de um intermediário. Por fim, para a obtenção do produto desejado, os pares de elétrons do oxigênio abstraem o hidrogênio da amina protonada regenerando o catalisador.

Esquema 19 - Proposta mecanística para a formação de **2** utilizando a BSA como biocatalisador.

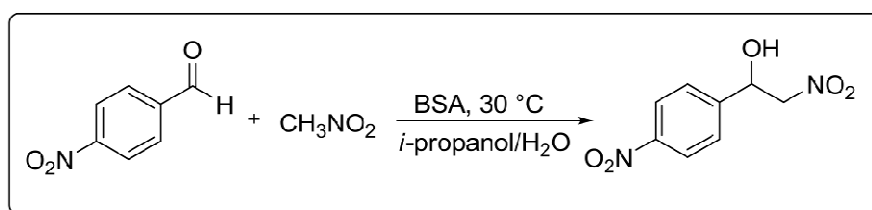


A reação aldólica estudada com a utilização da BSA como catalisador, está relatada na literatura visando estudar as características cinéticas da reação⁶⁴, com uma conversão de 80%. A BSA se apresenta como um bom catalisador, visto que obtivemos uma conversão equivalente ao de um organocatalisador nas mesmas condições reacionais.

3.3 Reação de Henry

Para a síntese de **3**, realizou-se uma reação inicial entre o *p*-nitrobenzaldeído e o nitrometano utilizando a BSA como catalisador. O solvente para essa reação foi uma proporção de 2:1 de isopropanol e água⁶⁷ (Esquema 20).

Esquema 20 - Síntese de **3** utilizando *i*-propanol/água como solvente da reação nitroaldólica.



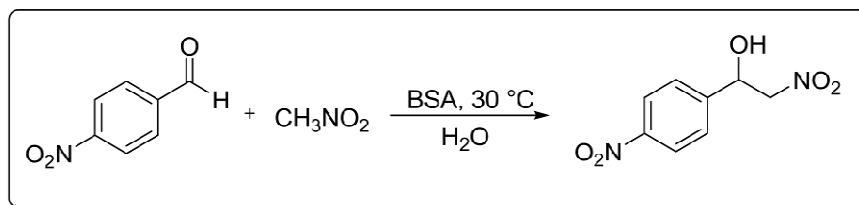
De acordo com Le⁶⁵, a reação com a BSA possui uma conversão de 16% em 24 horas. A reação modelo foi reproduzida conforme a metodologia proposta e os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 1) 10 mg de BSA; 2) 0,5 mL de água deionizada; 3) 1 mL de *i*-propanol; 4) 0,5 mmol de **1**; e 5) 10 mmol de nitrometano. É importante manter o excesso de nitrometano na reação de Henry, pois quando a reação ocorre com excesso de aldeído pode resultar em uma competição com condensações aldólicas, bem como epimerização.⁴⁶

Os resultados desta reação não foram bons. Em um período de 120 horas houve baixa conversão, somente 3% do material de partida havia sido consumido. Repetiu-se a reação, porém com outra ordem de adição dos reagentes sendo ela: 1) 0,5 mmol de **1**; 2) 1 mL de *i*-propanol; 3) 10 mmol de nitrometano; 4) 10 mg de BSA; e 5) 0,5 mL de água deionizada.

Houve uma diferença significativa de conversão seguindo essa nova ordem de adição dos reagentes. Em um período de 45 horas de reação, foi possível obter uma conversão de 34,7%. Este resultado prova a importância da ordem de adição dos reagentes em uma reação química.

Uma nova metodologia utilizando a BSA como catalisador e água como solvente foi testada⁴⁸, visando um maior rendimento para **3** e uma metodologia sintética sem a utilização de solventes orgânicos (Esquema 21).

Esquema 21 - Síntese de **3** utilizando água como solvente na reação nitroaldólica.



A síntese de **3** foi realizada de acordo com esta nova metodologia, utilizando somente água como solvente. O rendimento da reação foi de 80%, e os resultados obtidos através dos estudos com a BSA imobilizada, estão apresentados na Tabela

5.

Tabela 5 - Resultados obtidos na síntese de **3** utilizando a BSA livre e imobilizada.

Entrada	Catalisador	Rendimento %	ee %
1	BSA livre	80,0	-
2	BSA imobilizada	88,9	-
3	Nanopartícula	63,0	n.d.*
4	-	0,0	n.d.
5	BSA literatura ⁴⁷	98	6

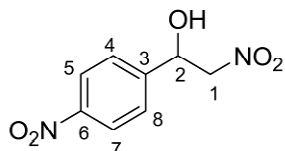
Tempo reacional de 30 horas.
0,3 mmol de **1**:0,7 μ mol de BSA
*n.d. – não determinado

Para a reação de Henry, foram observados bons rendimentos com a utilização da BSA. Através da técnica de imobilização, foi possível aumentar em 9,0% o rendimento de **3**. Como a BSA forma muita emulsão durante os processos de extração, ela foi removida do meio reacional através da aplicação de um campo magnético externo. Dessa forma, não houve a formação de emulsão durante as operações de extração, afetando diretamente no rendimento da reação de Henry. Entretanto, após a imobilização do biocatalisador não foi possível a otimização dos excessos enantioméricos para **3**. Existe na literatura relatos da reação de Henry catalisada por metais de transição²⁹, e por aminas primárias⁴⁵. Dessa forma, realizamos o estudo da reação de Henry apenas com a nanopartícula magnética funcionalizada (entrada 3), e observamos que houve a formação no produto **3**. A catálise que ocorreu pode ser promovida por duas vias: uma catálise metálica pelo ferro e através das aminas primárias que estão presentes na cadeia lateral do APTES (Esquema 16). Porém, para afirmar qual das duas catálises ocorreram na entrada 3 deve-se realizar outros experimentos envolvendo somente o APTES e a nanopartícula sem estar funcionalizada.

O composto **3** foi purificado por CCDP utilizando como gradiente de eluição 35% hexano/acetato de etila. Foi possível comprovar a formação do composto **3** por

Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H para o composto **3** (CDCl_3 , 300,19).



Dados Experimentais					Literatura ⁴⁷			
H	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)
1	4,60	m	2	-	4,61	m	2	-
2	5,63	m	1	-	5,68	m	1	-
4 e 8	7,64	d	2	7,24	7,63	d	2	6,5
5 e 7	8,26	d	2	8,28	8,26	d	2	6,5

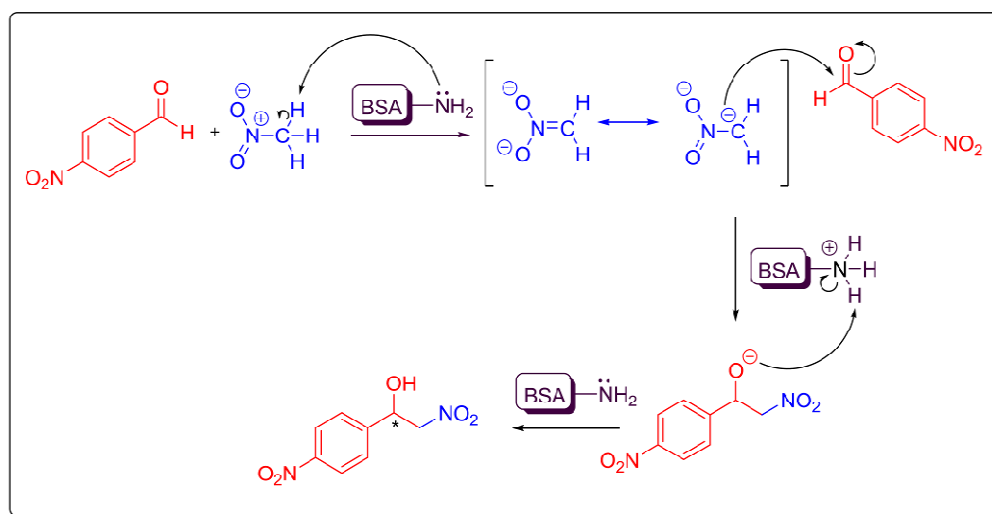
No RMN de ^1H de **3**, observa-se o deslocamento químico em 4,60 ppm com integração para 2 hidrogênios correspondente aos prótons do CH_2 (C1). O próton do carbono 2, possui um deslocamento químico de 5,63 ppm na forma de um multiplete integrado para um hidrogênio. Os sinais referentes aos prótons do anel aromático apresentaram deslocamentos químicos de 7,64 e 8,26 ppm.

Alguns inconvenientes surgiram durante a síntese e caracterização do produto **3**. Para aumentar o rendimento e facilitar na purificação do produto, outros catalisadores foram testados na reação de Henry (Tabela 7), sendo eles: lipase⁶⁵ imobilizada em resina acrílica (Novozyme 435), hidreto de lítio e alumínio⁴⁷, sal de amônio quartenário⁶⁶ e DMAP (4-dimetilaminopiridina)⁶⁷.

Tabela 7 - Catalisadores testados na síntese do composto **3**.

Entrada	Catalisador	Tempo h	Conversão %
1	Novozyme 435	72	traços
2	LiAlH ₄	6	4
3	Hidróxido de trietilamina	17	28
4	DMAP	30	5

O resultado obtido utilizando a BSA é bastante promissor. Tendo em vista que os outros catalisadores testados são bases fortes, podendo causar a formação de produtos secundários devido as reações de competição, como a reação de Canizzaro. A proposta mecanística para a formação de **3** tem como primeira etapa a formação de um carbânion que é ativado com a abstração do hidrogênio ácido pelo catalisador, posteriormente há o ataque nucleofílico do carbânion no aldeído, o oxigênio do intermediário formado irá capturar o próton da base sintetizando o produto desejado. Como na reação aldólica, Gotor e colaboradores⁴⁸, sugere que os resíduos dos aminoácidos de lisina são responsáveis pela catálise na reação de Henry. No esquema 22, está representado a proposta mecanística para a reação.

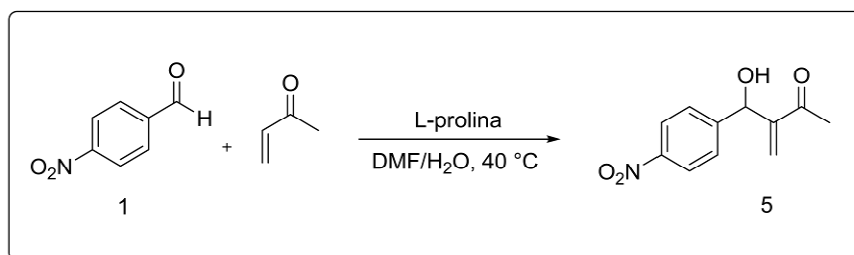
Esquema 22 - Proposta mecanística para a síntese de **3** utilizando a BSA como catalisador da reação.

A reação de Henry de acordo com Gotor e colaboradores⁴⁸, possui uma conversão maior que 90%. O resultado obtido para a síntese do padrão **3** está de acordo com a literatura tendo em vista que o rendimento obtido foi de 89%.

3.4 Reação de Morita-Baylis-Hillman

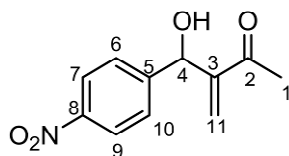
A etapa inicial para essa reação, consistiu na síntese e caracterização do aduto de MBH **5**. O composto **5** foi utilizado como padrão para monitoramento via GC-FID das reações de MBH catalisadas por BSA. Para sintetizar o padrão **5** empregou-se a prolina como catalisador, conforme o Esquema 23.⁶⁸

Esquema 23 - Reação de MBH para a síntese do composto **5**.



O rendimento bruto da reação foi de 97%. O produto obtido foi purificado por DSC e caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H, (Tabela 8).

Tabela 8 - Dados de RMN de ¹H para o composto **5** (CDCl₃, 300,19).

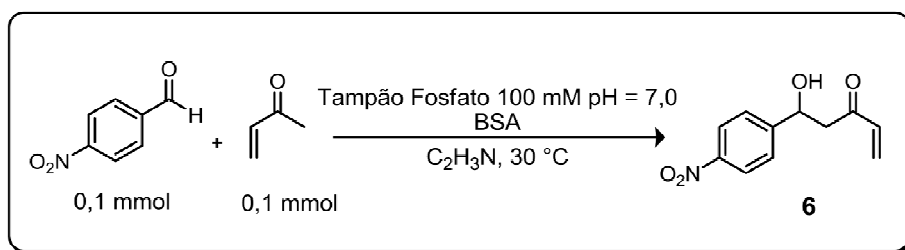


Dados Experimentais					Literatura ¹⁵			
H	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)
1	2,35	s	3	-	2,36	s	3	-
4	5,70	s	1	-	5,68	s	1	-
7-9	8,20	m	2	-	8,20	t	2	10,6
6-10	7,55	m	2	-	7,55	m	2	-
11	6,3	s	1	-	6,29	d	1	6,8
11	6,04	d	1	1,1	6,04	t	1	15,4

A presença dos deslocamentos químicos em 8,20 ppm e 7,55 ppm são correspondentes aos hidrogênios da porção aromática de **5**. O simpleto com δ de 5,70 ppm, confirma a formação da ligação C-C sendo correspondente ao hidrogênio do carbono 4. A metila, possui deslocamento químico de 2,35 com integração igual a três, indicando os três hidrogênios ligados ao carbono. Os sinais metilênicos correspondem aos deslocamentos em 6,3 ppm e 6,04 ppm, ambos sinais integram para um hidrogênio.

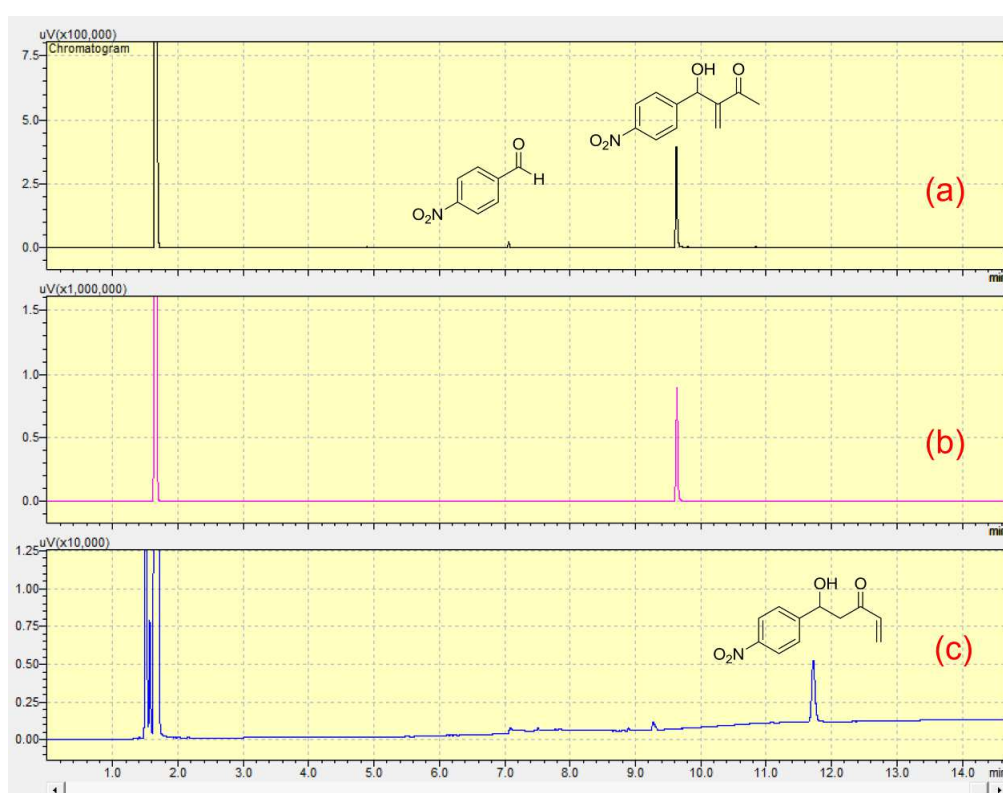
A reação de MBH para a síntese de **5** utilizando a BSA como catalisador, ainda não está descrita na literatura para os substratos trabalhados. Dessa forma, uma reação teste foi realizada nas seguintes condições reacionais (Esquema 24).⁶⁹

Esquema 24 - Reação de MBH utilizando a BSA como catalisador.



Em 30 horas de reação, foi observado todo o consumo do *p*-nitrobenzaléido e a formação de um único produto. Porém, pela análise comparativa dos cromatogramas da reação de MBH, e do composto **5** puro concluímos que não foi formado o produto desejado (Figura 15).

Figura 15 - Cromatograma da reação de MBH. a) L-prolina 40 °C; b) Produto **5** puro; c) BSA.



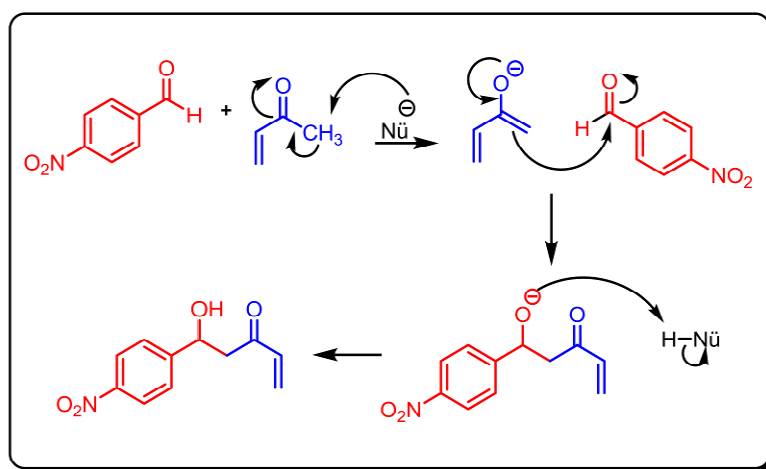
De acordo com Kapoor⁷⁰ pode ocorrer a formação do produto aldólico da reação dependendo das condições reacionais empregadas. Tendo em vista este inconveniente, a reação de MBH com a BSA foi realizada nas temperaturas de 30 °C, 37 °C e 45 °C (Tabela 9).

Tabela 9 - Influência da temperatura na reação de MBH.

Entrada	Temperatura °C	Conversão %
1	30	99
2	37	63
3	45	0

Valores de conversão obtidos para o produto **6**.
Tempo reacional de 30 horas.

Os testes realizados com o aumento da temperatura, mostraram apenas a diminuição da conversão, sem a formação do produto desejado. O mecanismo proposto para a formação do produto aldólico está ilustrado abaixo (Esquema 25):

Esquema 25 - Proposta mecanística para a formação do produto aldólico.

A primeira etapa do mecanismo é a formação do enolato proveniente da metilvinil cetona (MVK). O nucleófilo abstrai um dos hidrogênios ácidos do sistema α,β insaturado, e o aldeído sofre o ataque nucleofílico do enolato formado. O oxigênio com densidade negativa, abstrai novamente o hidrogênio gerando o produto aldólico da reação de MBH.

Uma possível explicação para a formação do produto aldólico na reação de MBH deve-se as condições experimentais que foram empregadas nesse sistema.

Neste caso a reação ocorreu com uma proporção de água:acetonitrila de 25:1 e pH = 7,0. Portanto, como o pH está mais básico ele pode ter favorecido a enolização do acrilato e abstração do hidrogênio ácido seguindo com a adição aldólica.

Uma outra estratégia para a síntese de **5** utilizando a BSA foi avaliada (Esquema 26). Foram realizadas alterações nas condições experimentais, sendo elas: 1) a reação ocorreu sob temperatura controlada de 40 °C e; 2) houve a substituição da solução tampão para o uso de água destilada e acetonitrila, em uma proporção de 4:1.

Esquema 26 - Reação de MBH otimizada.

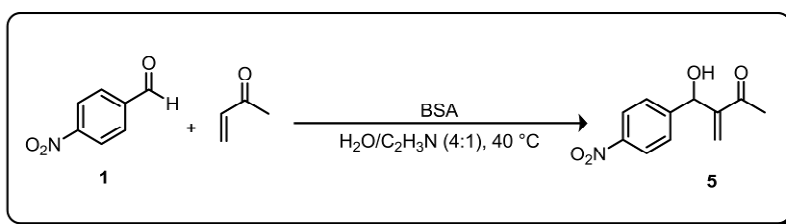


Tabela 10 - Resultados obtidos após otimização da reação de MBH para a síntese de **5**.

Entrada	Catalisador	Conversão %	ee %
1	BSA livre	30,0	6,0
2	BSA imobilizada	38,7	12,6
3	Nanopartícula	0,0	n.d.*
4	-	0,0	n.d.

Tempo reacional de 30 horas.

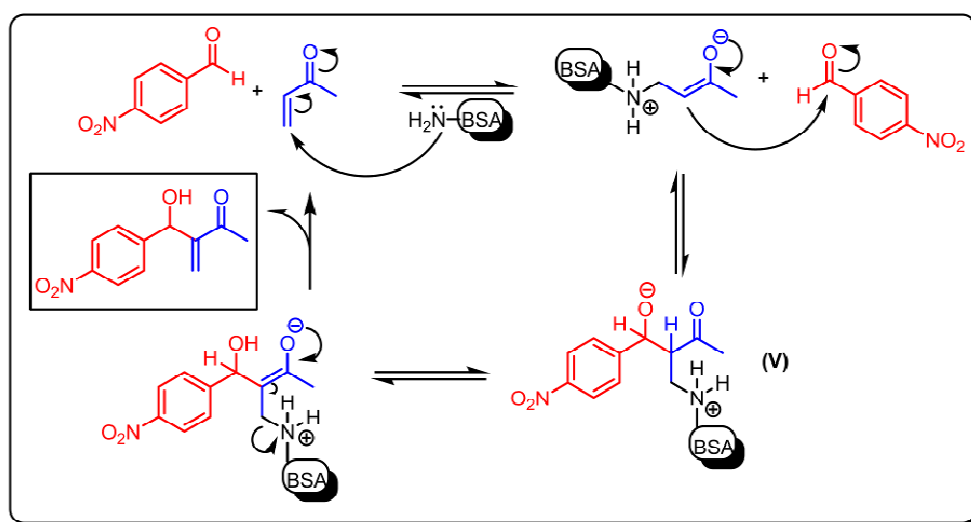
*n.d. – não determinado.

Através dos experimentos descritos nas entradas 1 e 4 (Tabela 10) podemos confirmar a atividade catalítica da BSA para sintetizar o aduto de MBH. Não foi observada a formação de subprodutos, com uma conversão de 30% em 30 horas. Quando a BSA imobilizada foi utilizada na reação de MBH, houve um aumento de 8,7% na conversão de **5**. Além disso, o excesso enantiomérico dobrou de 6,0%,

quando utilizada a BSA livre, para 12,6% com a proteína imobilizada. As vantagens em utilizar a BSA imobilizada na reação devem-se à facilidade no manuseio e operações *downstream*, que resultaram em maior rendimento. Como houve catálise promovida pela nanopartícula na reação de Henry, realizamos o mesmo estudo para a reação de MBH. Como já era esperado, não houve formação de produto eliminando a catálise metálica ou a catálise pelo APTES.

A proposta mecanística para a reação de MBH catalisada pela BSA está representada no Esquema 27.

Esquema 27 - Proposta mecanística para a reação de MBH utilizando a BSA



O mecanismo da reação se inicia com a adição de Michael da amina da BSA ao sistema α,β -insaturado, o *p*-nitrobenzaldeído sofre uma adição aldólica do azaenolato zwitteriônico gerando o zwitterion. Por fim, há a migração interna do próton e eliminação do catalisador fornecendo o produto **5**.

3.5 Engenharia do Meio Reacional para a Reação de MBH

Tendo em vista que os resultados obtidos para a reação de MBH com a BSA ainda não estão descritos na literatura, optamos por fazer um planejamento fatorial

completo (PFT) a fim de otimizar as condições reacionais visando melhorar a conversão e o excesso enantiomérico.

O planejamento reproduzido foi do tipo 2^3 , onde são avaliadas três variáveis em dois níveis (um máximo e um mínimo). As variáveis estudadas foram:

- 1) Temperatura: máximo 40 °C e mínimo 20 °C;
- 2) Concentração da BSA: máximo de 2,2 μmol e mínimo de 1,5 μmol ;
- 3) Condição do catalisador: máximo imobilizado e mínimo livre;

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Planejamento fatorial completo para a reação de MBH.

Entrada	Temperatura (°C)	BSA (μmol)	Condição	Conversão %	ee %
1	20	1,5	Livre	39,5	-
2	40	1,5	Livre	42,1	2
3	20	2,2	Livre	34,2	4
4	40	2,2	Livre	30,0	6
5	20	1,5	Imob.	37,8	2
6	40	1,5	Imob.	27,6	-
7	20	2,2	Imob.	29,1	5
8	40	2,2	Imob.	38,7	13

Tempo reacional de 30 horas.

Em uma primeira análise dos resultados obtidos no PFT observamos que a variável determinante para otimização dos resultados é a concentração do catalisador. Primeiramente, através das entradas 1 e 3, onde são mantidas a temperatura e condição do catalisador podemos observar que houve uma pequena diminuição na conversão, porém houve um aumento no excesso enantiomérico. O mesmo pode ser observado para as entradas 2 e 3, e, 5 e 7. Quando a temperatura foi mantida à 40 °C e a condição do catalisador imobilizado (entrada 7 e 8), afetou no aumento da conversão bem como do excesso enantiomérico, passando de 5 para 13%.

Os cálculos estatísticos realizados através dos resultados obtidos no PFT comprovaram que a variável com maior influência na resposta é a concentração do catalisador. Na Tabela 12 podemos observar o valor do efeito das variáveis quando estudadas separadamente. Bem como, a influência simultânea das variáveis nos resultados de conversão e excesso enantiomérico.

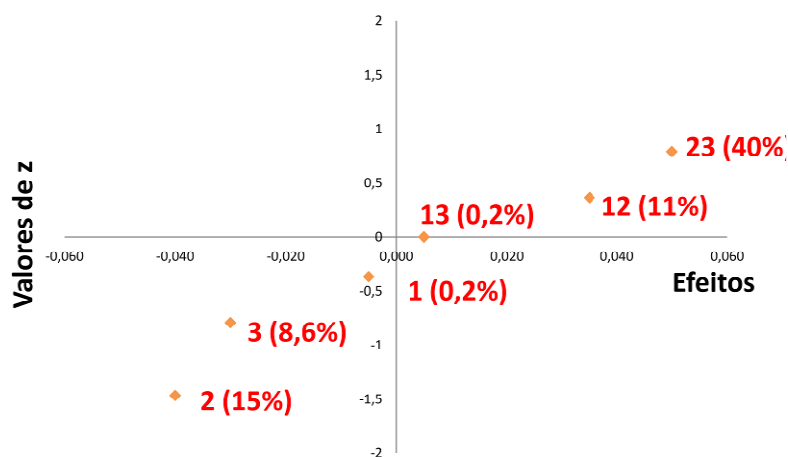
Tabela 12 - Valores do efeitos das variáveis estudadas no PFT.

Variável	Efeito	
1	0,2	
2	15,2	
3	8,6	Variáveis:
13	0,2	1-Temperatura
12	11,2	2- Concentração
23	23,8	3-Condição (Livre/Imobilizado)
123	40,2	
Soma	100	

No sistema estudado, as três variáveis juntas possuem uma influência de 40,2%. Porém, quando analisamos o efeito da variável 2 ela atua separadamente com um efeito de 15,2%. Além disso, quando essa mesma variável é estudada junto com as outras o valor no efeito aumenta.

Esses resultados podem ser melhores analisados quando plotados em um gráfico de probabilidade (Figura 16). Os valores que estão mais próximos ao zero não influenciam na resposta, enquanto os valores de efeito que estão mais distantes do zero exercem maior interferência nas respostas que foram analisadas.

Figura 16 - Gráfico de propabilidade.



Baseando-se nos resultados obtidos e na importância das variáveis: concentração da BSA e condição do catalisador, adotamos a entrada 8 para explorar a influência do aumento da concentração do biocatalisador. Portanto, a próxima estratégia visou aumentar a concentração do catalisador mantendo a imobilização para avaliar até quanto a concentração de BSA maximizava os resultados. (Tabela 13)

Tabela 13 - Caminho de ascendência variando a concentração do catalisador.

Entrada	BSA (μmol)	Condição	Conversão %	ee %
1	2,2	Imob	38,7	13
2	3,0	Imob	53,5	1
3	3,7	Imob	70,1	3
4	4,5	Imob	73,9	3

Através das entradas 1 e 4, observamos um aumento de 35,2% na formação do aduto de MBH. Este resultado reflete diretamente que a concentração do catalisador afeta no aumento da conversão da reação de MBH. Porém, o aumento expressivo de conversão ocorre entre as entradas 2 e 3. Passando de 53,5% utilizado 3,0 μmol de BSA para 70,1% quando empregado 3,7 μmol de proteína. O acréscimo de 50 mg de biocatalisador entre as entradas 3 e 4, não é tão eficaz visto

que a conversão aumenta apenas para mais 3,8%.

Os valores de excessos enantioméricos mantiveram-se racêmicos. Uma possível explicação para estes resultados de ee deve-se ao fato que a BSA é uma proteína, e diferente das enzimas, não possui um sítio ativo para catalisar as reações. Desta forma, os resíduos de aminoácidos que estão presentes na superfície da BSA irão catalisar as reações sem especificidade.

3.6 Reutilização do Biocatalisador

Através do caminho de ascendência, notamos que o aumento significativo na conversão ocorreu entre as entradas 1 e 3. Para explorar o método de imobilização utilizado, e verificar a retenção de atividade catalítica, a proteína imobilizada nas nanopartículas de óxido de ferro na condição otimizada (Esquema 28) foi submetida aos experimentos de reuso do biocatalisador (Figura 17).

Esquema 28 - Reação de MBH otimizada para os parâmetros estudados.

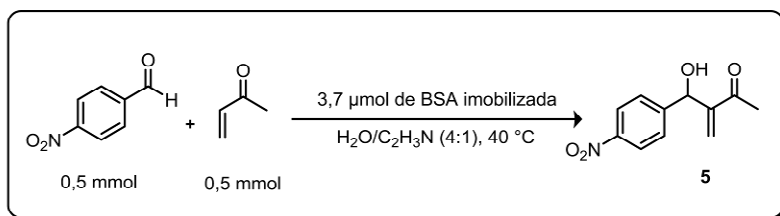
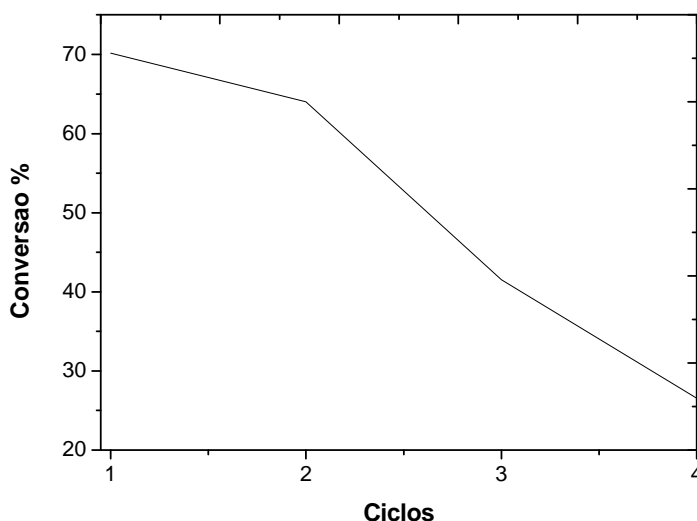


Figura 17 - Reuso da BSA imobilizada em nanopartículas de óxido de ferro.

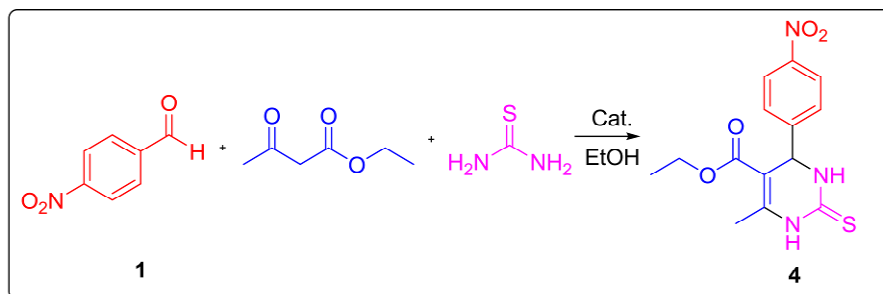


Foi possível observar que a BSA imobilizada não manteve sua atividade catalítica inicial. Houve o decaimento na conversão da reação de MBH, passando de 70,15 %, para 28,58 % no quarto ciclo.

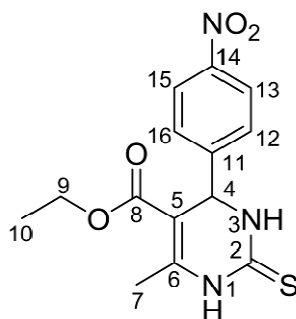
A vantagem da imobilização do tipo M-CLEA para a BSA, na reação de MBH, se limita à facilidade de recuperação do biocatalisador. Pois como as nanopartículas utilizadas são magnéticas, a BSA pode ser removida facilmente com a aplicação de um campo magnético externo que facilitam as operações de *downstream*.

3.7 Reação de Biginelli

Para a síntese de **4** foram avaliadas duas estratégias sintéticas, a primeira utilizando utilizando catalisadores químicos como o DABCO⁷¹ e cloreto de amônio (NH₄Cl)⁷² e a segunda, utilizando a BSA livre/imobilizada como biocatalisador⁷³ (Esquema 29).

Esquema 29 - Reação de Biginelli para a síntese de **4**.

As análises de RMN de ^1H , bem como de Espectrometria de Massas sugerem a formação do produto **4**, apesar das mesmas terem sido realizadas em uma amostra semi-purificada.

Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H para o composto **4** (CDCl_3 , 300,19).

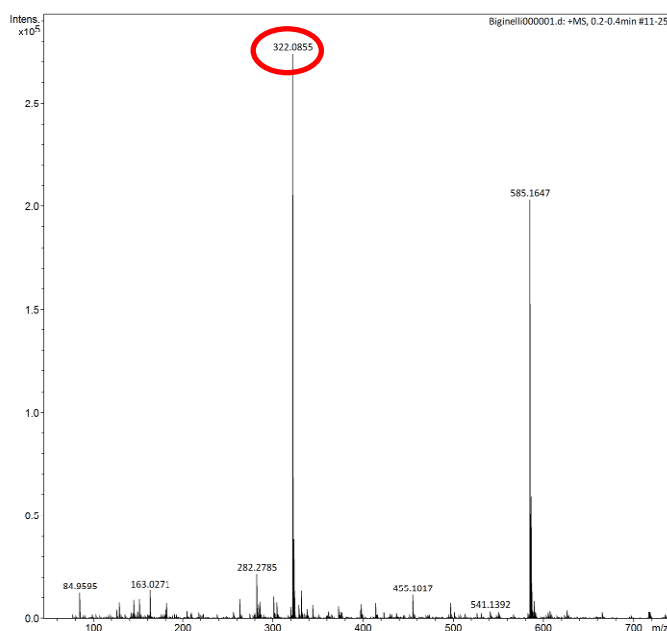
Dados Experimentais					Literatura ⁷³			
H	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)	δ (ppm)	m	Integ.	J (Hz)
1	7,73	s	1	-	7,87	s	1	-
3	8,19	s	3	-	8,02	s	2	-
4	5,53	d	1	4,14	5,52	d	1	3,0
7	2,40	s	3	-	2,39	s	3	-
9	4,15	m	2	-	4,13	q	2	6,8

10	1,22	s	3	-	1,21	t	2	7,2
12 e 16	7,51	d	2	8,7	8,20	d	2	9,0
15 e 13	8,20	d	3	8,8	7,48	d	2	8,7

O duplete com deslocamento químico de 5,56 ppm é referente ao carbono assimétrico de **4**, os sinais do grupo etila estão presentes no deslocamento químico de 4,15 ppm e 1,22 ppm, pode-se observar o simpleto em 7,75 ppm, que corresponde à uma das aminas presentes na estrutura. Observa-se também, junto com os sinais do aromático, um simpleto em 8,19 ppm, sugerindo a presença da amina (3).

No espectro de massas obtido via inserção direta da amostra em fonte de ionização por eletron spray no modo positivo, observou-se a presença do íon m/z 322.08, correspondente à $[M+H]^+$ de **4** (Figura 18).

Figura 18 - Espectro de massas (ESI-(+)-MS) para o composto **4**.



Entretanto, não foi possível atribuir o pico correspondente ao aduto de Biginelli nos cromatogramas obtidos por GC-FID (Figura 19), impossibilitando o

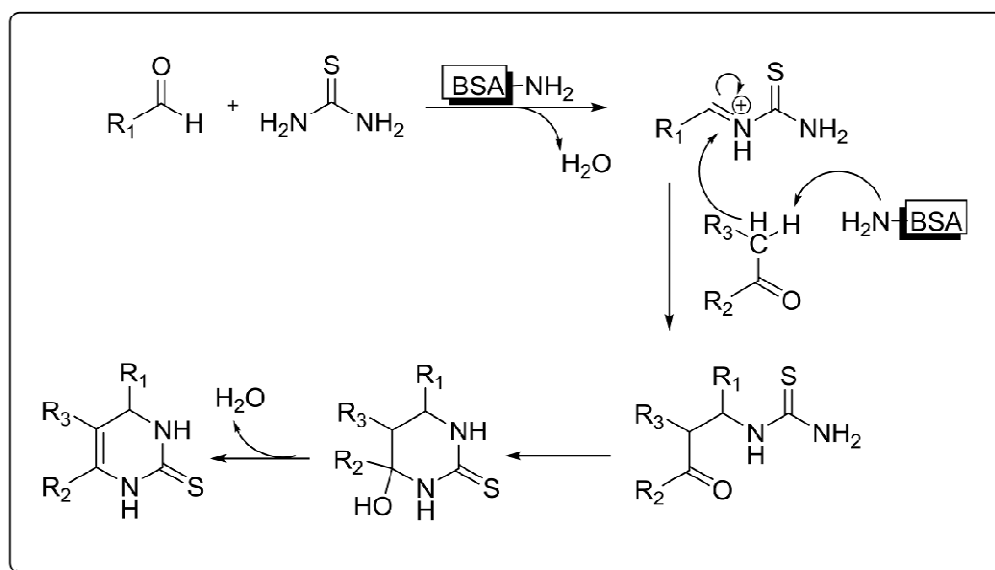
monitoramento da conversão do material de partida no produto de Biginelli.

Figura 19 - Cromatograma obtido para a Reação de Biginelli.



Sharma⁷³ apresentou uma proposta mecanística plausível para a reação de Biginelli catalisada pela BSA. Os autores sugerem que os resíduos básicos dos aminoácidos da proteína são responsáveis pela catálise da reação (Esquema 30)

Esquema 30 – Proposta mecanística para formação de DHPM catalisado pela BSA.



A primeira etapa do mecanismo da reação é o ataque da tiouréia no grupo carbonila do aldeído levando à formação de um íon imínio. Em seguida há a retirada do próton a partir da ativação do acetoacetato de etila devido ao equilíbrio ceto-enólico existente na estrutura pelo grupo amino básico da BSA. O intermediário formado sofre uma ciclização intramolecular, seguida de uma condensação formando o DHPM desejado.

De acordo com a literatura⁷³, a reação de Biginelli utilizando a BSA possui um rendimento de 77%. Esta reação se apresenta efetiva para a síntese de DHPMs, pois é uma metodologia branda e de alta convergência para produtos com alta atividade biológica como os DHPMs. Porém, no nosso caso a dificuldade na purificação de **4** inviabilizou o monitoramento/estudo da reação de Biginelli.

Considerações
Finais

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram propostas a síntese de quatro blocos construtores (**2**, **3**, **4** e **5**) utilizando a BSA como biocatalisador. A síntese de **2** e **3** foi realizada conforme metodologias propostas na literatura. Empregando condições reacionais brandas e reagentes ambientalmente amigáveis. Os resultados de conversão para o produto **2** aqui obtidos foram menores que as conversões relatadas na literatura visto que o tipo de BSA obtida comercialmente pode afetar a conversão. Entretanto, na reação de Henry para síntese do produto **3** os valores de rendimento se assemelham com os resultados descritos na literatura. Porém, na reação de Biginelli as dificuldades obtidas durante a purificação de **4** impediram o estudo da catálise da BSA nesta reação.

Durante a reação de MBH para a síntese de **5**, observou-se dois fatores através da mudança nas condições experimentais sendo eles: 1) 100% de conversão no produto aldólico ao invés do aduto de MBH, e 2) com a mudança de temperatura de 30 °C para 40 °C e a substituição da acetonitrila por um proporção de água/solvente de 4:1 foi possível sintetizar o aduto de MBH **5**, com conversão de 30%. A BSA apresenta um alto potencial biocatalítico, visto que as reações formadoras de ligação C-C apresentaram baixa conversão ou nenhuma, no produto desejado sem a presença da mesma.

A imobilização em nanopartículas de óxido de ferro foi efetiva. Tendo em vista as análises de espectroscopia no infravermelho, as fotos microscopia eletrônica de varredura e a atividade catalítica comprovada pelas reações reproduzidas.

As reações empregando o uso do biocatalisador imobilizado foram eficientes e cada reação teve sua particularidade. Na reação aldólica não foram observados aumentos na conversão e nos excessos, porém a técnica de imobilização facilitou a retirada do catalisador do meio reacional. Na reação de Henry houve o aumento do rendimento da reação, afetado diretamente pela técnica de imobilização empregada, mas não ocorreram grandes alterações nos excessos enantioméricos, mantendo-se racêmicos. Para a reação de Morita-Baylis-Hillman, houve um aumento na conversão do aduto MBH e o excesso enantiomérico dobrou de 6,0% para 13,0%. E

em relação à reação de Biginelli, observou-se a diminuição no consumo do material de partida.

Como a reação mais promissora dentre as estudadas foi a reação de MBH, realizamos um planejamento fatorial completo que possibilitou estabelecer uma metodologia otimizada para esta reação. Assim, variando o valor de temperatura, concentração do catalisador e condição do catalisador a condição reacional otimizada foi alcançada. Para a síntese do aduto **5** utilizando a BSA como catalisador a melhor condição reacional encontrada baseia-se na utilização de 0,0037 mmol de BSA imobilizada, catalisando uma reação entre 0,5 mmol de **1** e 0,5 mmol MVK à 40 °C com uma proporção de 4:1 de água/acetonitrila atuando como solvente. Dessa forma, também observamos que a BSA não apresenta um comportamento seletivo, visto que os excessos enantioméricos variaram em cada experimento. Além disso, os resultados dos experimentos em ascendência mostraram que, de fato, o aumento da concentração da BSA afeta diretamente no aumento da conversão na reação de MBH, porém a partir de 0,0037 mmol de catalisador esse aumento não é tão expressivo.

Com a condição otimizada da reação de MBH foi possível avaliar o reuso do biocatalisador. Observamos a diminuição na conversão do aduto de MBH a partir do segundo ciclo.

*Procedimento
Experimental*

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Considerações Gerais

5.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes foram adquiridos junto a empresa Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia. Os solventes foram utilizados em grau PA, HPLC ou *ultra-dry*.

5.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram registrados no espectrômetro Bruker – Fourier 300 ($B_0 = 7,05\text{ T}$) a 300,19 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio foram registrados em ppm utilizando como referência CDCl_3 ($\delta = 7,26$). As constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz) e os sinais foram caracterizados como: duplete (d), duplo duplete (dd), multiplete (m) e simpleto (s).

5.1.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C foram registrados no espectrômetro Bruker – Fourier 300 ($B_0 = 7,05\text{ T}$) e Bruker – Ascend 600 III, operando a 75,04 MHz e 150,03 MHz, respectivamente. Os sinais de deslocamentos químicos de carbonos foram registrados em ppm, sendo $\delta 77,0$ para CDCl_3 .

5.1.4 Cromatografia Gasosa Acoplada a um Detector de Ionização de Chamas (GC-FID)

As análises por GC-FID foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 Plus equipado com injetor automático AOC-20i e

acoplado a um detector de ionização de chamas. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás H₂ de 40 mL min⁻¹, temperatura do injetor igual a 200 °C. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx[®]-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5 – 1 mg mL⁻¹ no modo *splitless*. A programação utilizada foi 80 °C por 3 minutos, 80 – 280 °C com rampa de aquecimento à 30 °C / min, e mantidas a 280 °C por 5 minutos.

5.1.5 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso modelo Shimadzu GC-2010 equipado com um injetor automático AOC-5000 e acoplado a um detector de massas Shimadzu MS2010plus com impacto de elétrons (IE, 70 eV) no Instituto de Química de São Carlos sob os cuidados do Prof. Dr. André Luiz Meleito Porto. O cromatógrafo operou a um fluxo constante de gás He de 40 mL min⁻¹, temperatura do injetor igual a 260 °C. Para CG foi utilizada coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano). As injeções das amostras foram de 1 µL na concentração de 0,5-1 mg mL⁻¹.

5.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises cromatográficas líquidas de alta eficiência foram realizadas utilizando um cromatógrafo JASCO[®] com controlador LC-NET II/ADC, detector de arranjo fotodiodos MD-2018 PLUS, bomba PU-2086 plus, injetor automático AS-2055 e detector de dicróismo circular (CD-2095). As injeções das amostras foram de 10 µL na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Utilizou-se a coluna Diacel, de sílica encapada com celulose ligada a 3,5- dimetilfenilcarbamato (250 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna (10 x 4,6 mm, 5µm), modelo Chiralcel OD-H (fase normal). O cromatógrafo operou em modo isocrático com fase móvel composta por 85% hexano e 15% isopropanol.

Temperatura do forno de 25 °C e comprimento de onda de 254 nm.

5.1.7 Cromatografia em Camada Delgada e Tubular

As reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em cromatoplasmas de 20x10 cm da Merck com suporte de alumínio com filme de sílica gel 60 F₂₅₄.

As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com sílica gel da Sigma-Aldrich (tamanho da partícula 2-25 µm), com fluoresceína. As placas foram confeccionadas com espessura de 0.75 mm sobre placas de vidro de 20 x 20 cm.

As cromatografias em DSC (*Dry Silica Column*) foram realizadas com sílica gel 230-400 mesh da marca Macherey-Nagel, com gradiente de eluição hexano/acetato de etila.

A revelação dos compostos com grupos cromóforos foi realizada utilizando radiação ultravioleta no comprimento de onda λ de 254 nm.

5.1.8 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro modelo Thermo Scientific Nicolet iS5, com transformada de Fourier, no modo Attenuated Total Reflectance (ATR) (4000 a 500 cm⁻¹).

5.1.9 Microscopia Eletrônica de Varredura Convencional (MEV)

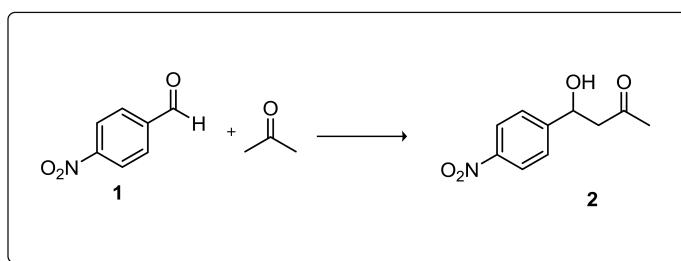
As fotografias de microscopia eletrônica de varredura foram registradas em um microscópio Topcon, modelo SM 300 convencional. As amostras foram depositadas sobre um porta amostras de carbono e metalizadas com ouro.

5.1.10 Espectrometria de Massas

As análises de Espectrometria de Massas foram realizadas utilizando-se um espectromêtro modelo Bruker MaXis impact com ionização por electrospray operando no modo positivo de análise. Os espectros adquiridos foram realizados com voltagem de ESI de 5kV, pressão do gás nebulizador de 0,3 bar, vazão do gás de secagem de 4,0 L min⁻¹ e temperatura do capilar de transferência de 180 °C.

5.2 Síntese dos padrões 2, 3, 4 e 5

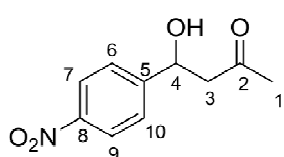
5.2.1 Síntese do composto 4-hidroxi-4-(8-nitrofenil)butan-2-ona (**2**).



i) Metodologia 1: A síntese do produto **2**, foi realizada em um balão de fundo redondo de 25 mL dissolvendo-se 13 mg de BSA em 9,0 mL de uma solução de tampão fosfato (pH 7,5, 100 mM), seguida da adição de 0,015 g (0,1 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído em 1,0 mL de acetonitrila e de 1,0 mL de acetona. A reação ocorreu protegida da luz, com temperatura controlada de 37 °C e agitação magnética. A reação foi acompanhada por GC-FID e CCD. Interrompeu-se a reação com adição de 5,0 mL de acetato de etila e a fase aquosa extraída três vezes com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e o produto bruto concentrado a pressão reduzida. A purificação do produto foi realizada em CCDP (50% Hexano/Acetato de etila; R_f = 0,2).

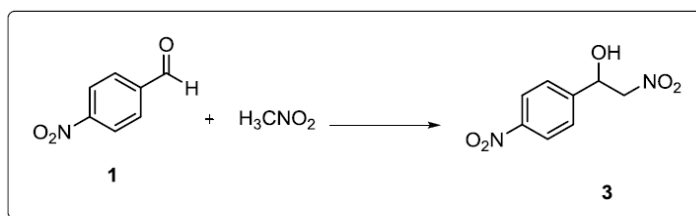
ii) Metodologia 2: Em uma balão de fundo redondo 0,030 g (0,2 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído foram adicionados, seguidos da adição de 4,2 mg de L-prolina, 1,8

mL de acetona e 0,2 mL de água destilada. A reação ocorreu sob temperatura controlada de 25 °C com agitação magnética. Interrompeu-se a reação com adição de 2,0 mL de água e a fase aquosa extraída três vezes com acetato de etila. As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de magnésio anidro e concentrada a pressão reduzida. A purificação do produto foi realizada em CCDP (50% Hexano/Acetato de etila).



4-hidroxi-4-(8-nitrofenil)butan-2-one: **FM** C₁₀H₁₁NO₄ **MM** 209,20, óleo amarelado; **EM** *m/z* (%) 207 (98%), 281 (43%) (M⁺); **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ: 8.26 – 8.17 (d, 2H, H7-H9), 7.58 – 7.49 (d, 2H, H6-H10), 5.26 (dd, *J* = 7.7, 4.5 Hz, 1H, H4), 2.88 – 2.81 (d, 2H, H3), 2.22 (s, 3H, H1).

5.2.2 Síntese do composto 1-nitro-2-hidroxi-2-(4-nitrofenil)-etanol (**3**).



i) Metodologia 1: Em um balão de fundo redondo de 5,0 mL adicionou-se 0,045 g (0,3 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído e 50 mg de BSA. Em seguida foram adicionados 1250 μL de água destilada e 310 μL de nitrometano. A reação ocorreu com agitação magnética a 30 °C. Interrompeu-se a reação adicionando-se 5,0 mL de água destilada, e a fase aquosa foi extraída três vezes com acetato de etila. As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de magnésio e o produto bruto concentrado a pressão reduzida. O composto foi purificado por CCDP (35% Hexano/Acetato de etila; R_f = 0,2).

ii) Metodologia 2: A síntese de **2** iniciou-se com a adição de 10 mg de BSA em um balão de fundo redondo, posteriormente 0,5 mL de água deionizada, 0,075 g (0,5 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído e 640 µL de nitrometano foram adicionados ao meio reacional. A reação foi interrompida com a adição de acetato de etila, e monitorada por CCD e CG-FID.

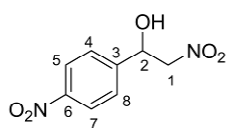
iii) Metodologia 3: 0,075 g (0,5 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído, seguida da adição de 700 µL de nitrometano, 10 mg de lipase imobilizada em resina acrílica (Novozyme 435), 1,0 mL de *n*-propanol e 0,5 mL de água destilada. A reação foi interrompida com a adição de acetato de etila, e monitorada por CCD e CG-FID.

iv) Metodologia 4: 0,0037 g (1 mmol) de hidreto de lítio e alumínio (LiAlH₄) seguida da adição de 2,0 mL de tetraidrofurano seco (THF), a mistura foi agitada durante 30 minutos com temperatura controlada de 0 °C. Após esse período 272,5 µL de nitrometano foram adicionados ao meio e a reação agitada por mais 30 minutos. Por fim, 0,1511 g (1 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído foi adicionado ao meio reacional e a reação foi agitada durante 6 horas com temperatura controlada de 0 °C. A reação foi interrompida com a adição de acetato de etila, e monitorada por CCD e CG-FID.

v) Metodologia 5: Em um balão de fundo redondo 0,1511 g (1 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído foram pesados, seguido da adição de 109 µL de nitrometano, 3,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,025 M) e 18 mg (0,1 mmol) de hidróxido de tetrametilamônio. A reação ocorreu com temperatura controlada de 30 °C, com agitação magnética, durante 17 horas. A reação foi interrompida com a adição de acetato de etila, e monitorada por CCD e CG-FID.

vi) Metodologia 6: Em um balão de fundo redondo 0,1511 g (1 mmol) *p*-nitrobenzaldeído foram pesados, seguido da adição de 54,5 µL de nitrometano, 6,0 mg (0,05 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e 1,0 mL de *n*-propanol. A reação

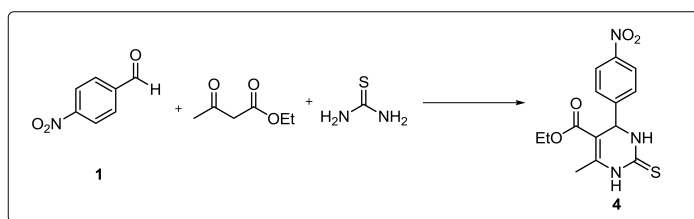
ocorreu com temperatura controlada de 30 °C, com agitação magnética, durante 30 horas. A reação foi interrompida com a adição de acetato de etila, e monitorada por CCD e CG-FID.



1-nitro-2-hidroxi-2-(4-nitrofenil)-etanol: **FM** C₈H₈N₂O₅ **MM** 212,16

RMN de ¹H (300,19 MHz, CDCl₃) δ: 4.60 (m, 2H, H1), 5.63 (m, 1H, H2), 7.64 (d, 2H, H4-H8, *J* = 7,64 Hz), 8.26 (d, 2H, H5-H7, *J* = 8,28 Hz).

5.2.3 Síntese do composto 1,2,3,4-tetrahidro-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-tioxopirimidina-5-carboxilato de etila (**4**).

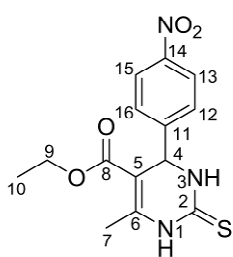


i) Metodologia 1: Pesou-se 0,0378 g (0,025 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído e foram adicionados 40 μL de acetoacetato de etila, 0,0191g (0,025 mmol) de tiouréia e 50 mg de BSA em 3,0 mL de etanol. A reação permaneceu sob agitação magnética durante 30 horas a 60 °C. Após resfriamento do meio reacional, os cristais foram precipitados conforme o resfriamento acontecia, lavados com água destilada gelada e recristalizados em etanol.

ii) Metodologia 2: Pesou-se 0,1511 g (1 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído e foram adicionados 126,4 μL de acetoacetato de etila, 0,0913 g (1 mmol) de tiouréia, 0,0112 g (0,1 mmol) de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) e 5,0 mL de etanol, a reação ocorreu sob temperatura de 78,8 °C. Após resfriamento do meio reacional, os cristais foram precipitados conforme o resfriamento, lavados com água destilada gelada e recristalizados com etanol.

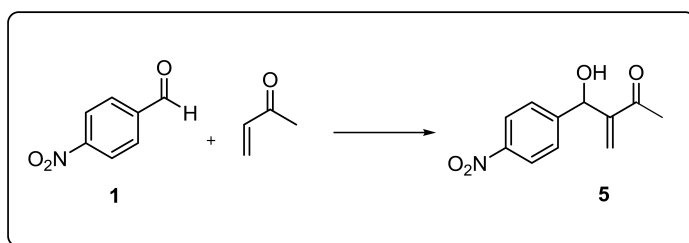
iii) Metodologia 3: Pesou-se 0,3022 g (2 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído e foram adicionados 253 μ L de acetoacetato de etila, 0,2283 g (2 mmol) de tiouréia, 0,0427 g (0,8 mmol) de cloreto de amônio (NH₄Cl). A reação ocorreu durante 3 horas com temperatura de 100,0 °C e foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada gelada. Os cristais foram lavados com outros 50 mL de água destilada gelada e recristalizados com etanol.

iv) Metodologia 4: Pesou-se 0,7556 g (5 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído e foram adicionados 640 μ L de acetoacetato de etila, 0,3806 g (5 mmol) de tiouréia, 0,2971 g (1,25 mmol) de cloreto de níquel hexahidratado e 10 mL de etanol. A reação ocorreu por 24 horas com temperatura de 78,8 °C e foi interrompida deixando o sistema atingir a temperatura ambiente, posteriormente a reação foi mantida em banho de gelo por 1 hora. Os cristais foram lavados com 25 mL de água gelada e 30 mL de uma mistura de água-etanol, os sólidos foram secos e recristalizados com etanol.



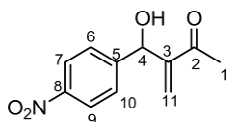
1,2,3,4-tetrahydro-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-tioxopirimidina-5-carboxilato de etila: **FM** C₁₄H₁₅N₂O₄S **MM** 321,35, **p.f.** 207-209 °C, sólido amarelado; **EM** (ESI-(+)-MS) *m/z* 322,08 [M+H]⁺, modo positivo. **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃) δ : 8.20 (d, *J* = 9,0 Hz, 3H, H13-H10), 7.73 (s, 1H, NH), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H12-H11), 5.53 (d, *J* = 4,14 Hz, 1H, H4), 4.15 (m, 2H, H9), 2.40 (s, 3H, H7), 1.23 (s, 1H).

5.2.4 Síntese do composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)-3-metileno-butan-2-ona (**5**).



i) Metodologia 1: A síntese de **5** foi realizada pesando-se 0,0755 g (0,5 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído, seguida da adição de 41 μ L de metil vinil cetona (MVK), 4,0 mL de água destilada, 1,0 mL de acetonitrila e 150 mg de BSA. A reação ocorreu sob temperatura controlada de 40 °C com agitação magnética. A reação foi interrompida com a adição de 5 mL de água destilada, a fase aquosa três vezes com 5 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) e o produto bruto concentrado à pressão reduzida. O composto **5** foi purificado por cromatografia em sílica seca (DSC) utilizando como gradiente de eluição Hexano/Acetato de etila.

ii) Metodologia 2: A síntese do composto **5** foi realizada em um balão de fundo redondo de 5 mL pesando 0,1511 g (1 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído, adicionando-se 251 μ L de metil vinil cetona (MVK), 900 μ L dimetilformamida (DMF) e 100 μ L água destilada. Posteriormente, houve a adição de 11,5 mg (0,1 mmol) de prolina e 0,021 g (0,2 mmol) de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). A reação ocorreu durante 16 horas, sob temperatura controlada de 40 °C. A reação foi interrompida com a adição de 5 mL de água destilada, a fase aquosa três vezes com 5 mL de acetato de etila e salmoura, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro (NaSO_4) e o extrato concentrado à pressão reduzida. O composto **5** foi purificado por cromatografia em sílica seca (DSC) utilizando como gradiente de eluição Hexano/Acetato de etila.



4-hidroxi-4-(8-nitrofenil)-3-metileno-butan-2-ona **FM** C₁₁H₁₁NO₄

MM 221,21, óleo amarelado. **RMN de ¹H** (300,19 MHz, CDCl₃)

δ: 8.2 (m, 2H, H9-H7), 7.6 (m, 2H, H6-H10), 6.3 (s, 1H, H11),

6.04 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz, H11), 5.7 (s, 1H, H4), 2.4 (s, 3H, H1).

5.3 Imobilização da BSA em nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas foram preparadas em colaboração com o professor Dr. Rodrigo Costa Marques do Grupo de Pesquisa de Materiais Magnéticos e Colóides do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara.

A imobilização foi realizada em um reator encamisado, à temperatura de 2 °C, com a adição de 16 mL de polietileno glicol 400 (PEG 400) a uma solução contendo 40 mg de BSA e 40 mg de nanopartículas magnéticas em tampão fosfato 100 mM pH 7,0. Após a adição do PEG 400, uma solução aquosa de glutaraldeído 25 % foi adicionado ao reator gerando uma concentração final de 25 mM. Após três horas de reação, dobrou-se o volume da reação com a adição de tampão bicarbonato de sódio 200 mM pH 10,0. Após 30 minutos, 25 mg de boroidreto de sódio foi adicionado ao meio reacional, deixando a solução reagir por mais 30 minutos. A recuperação da BSA imobilizada foi realizada com a aplicação de um campo magnético externo e extraídas várias vezes com água destilada.

A caracterização da BSA imobilizada, foi realizada por espectroscopia no infravermelho e MEV (Microscopia eletrônica de varredura).

IV (ATR) ν (cm⁻¹): 3250, 2477, 1710, 1000, 500.

5.4 Reações empregando o biocatalisador imobilizado

As reações empregando o biocatalisador imobilizado seguiram os mesmos procedimentos descritos na síntese dos padrões, porém com a substituição do

catalisador livre pela versão imobilizada na mesma quantidade.

5.5 Planejamento Fatorial Completo (PFT)

Os estudos com o PFT foram realizados para a reação de MBH. E se basearam em três variáveis: temperatura, concentração do biocatalisador e condição do biocatalisador. Dessa forma, o planejamento reproduzido foi do tipo 2^3 , e os cálculos para visualização dos efeitos das variáveis, foram realizados no *software* Microsoft Excell.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 ELKGROUP'S. **Biocatalysis**. Graz: University of Graz, Department of Chemistry. Disponível em: <<http://biocatalysis.uni-graz.at/>>. Acesso em: 21 dez. 2015.
 - 2 BIOCATALYSIS: definition. **Nature.com**. Disponível em: <<http://www.nature.com/subjects/biocatalysis>>. Acesso em: 21 dez. 2015.
 - 3 BORNSCHEUERE, U. T.; HUISMAN, G. W.; KAZLAUSKAS, R. J.; LUTZ, S.; MOORE, J. C.; ROBINS, K. Engineering the thirdwave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, p. 185-194, 2012.
 - 4 RIVA, S. 1983-2013: the long wave of biocatalysis. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 120-121, 2013.
 - 5 CIRIMINNA, R.; PAGLIARO, M. Green chemistry in the fine chemicals and pharmaceutical industries. **Organic Process Research Development**, v. 17, p. 1479-1484, 2013.
 - 6 FERNANDEZ, V. G.; GOTOR, V.; BUSTO, E.; LOPEZ-IGLESIAS, M. Use of protease from *Bacillus licheniformis* as a promicuous catalyst for organic synthesis: application in C-C and C-N bond formation reaction. **Advances Synthesis Catalysis**, v. 353, p. 2345-2353, 2011.
 - 7 REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12480-12496, 2013.
 - 8 FASAN, R. Natural, engineered, and artificial biocatalysts for organic synthesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 20, p. 5537-5538, 2014.
 - 9 GRIENGL, H.; SCHWAB, H.; FECHTER, M. The synthesis of chiral cyanohydrins byoxynitrilases. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 252-256, 2000.
 - 10 HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 601-607, 2003.
 - 11 NASAGAWA, T.; NAKAMURA, T.; YAMADA, H. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 322-324, 1990.
 - 12 FRANCIS, J. C.; HANSHE, P. E. Directed evolution of metabolic pathways in microbial populations. Modification of the acid phosphatase pH optimum in *S. cerevisiae*. **Genetics**, v. 70, p. 58-73, 1972.
-

- 13 JIANG, L.; HONG-WEI, Y. An example of enzymatic promiscuity: the Baylis-Hillman reaction catalyzed by a biotin esterase (BioH) from *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 99-103, 2013.
- 14 HULT, K.; BERLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 231-238, 2007.
- 15 PETERS, T. Jr. **All about albumins**: biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego: Academic press, 1996. 432 p.
- 16 GAGGERO, N.; ALBANESE, D. C. M. Albumin as a promiscuous biocatalyst in organic synthesis. **RSC Advances**, v. 5, p. 10588-10598, 2015.
- 17 MILAGRE, C. D. F.; CABEÇA, L. F.; ALMEIDA, W. P.; MARSAIOLI, A. J. β -Lactam antibiotics epitope mapping with STD NMR spectroscopy: a study of drug-human serum albumin interaction. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 403-408, 2012.
- 18 VARSHNEY, A.; SEN, P.; AHMAD, E.; REHAN, M.; SUBBARAO, N.; KHAN, R. H. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? **Chirality**, v. 22, p. 77-87, 2010.
- 19 SUGIMOTO, T.; MATSUMURA, Y.; TANIMOTO, S.; OKANO, M. Asymmetric reduction of aromatic ketones by sodium borohydride in the presence of bovine serum albumin. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 21, p. 926-927, 1978.
- 20 SHELDON, R. A.; van PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.
- 21 GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed. Nova Jersey: Humana press: 2006. 465 p.
- 22 KOPP, W.; COSTA, T. P.; PEREIRA, S. C.; JAFELICCI JUNIOR, M.; GIORDANO, R. C.; MARQUES, R. F. C.; MOREIRA, F. M. A.; GIORDANO, R. L. C. Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: catalytic and morphological studies. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 38-46, 2014.
- 23 SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 1437-1451, 2012.
- 24 TORRES, M. P. G.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: study of their catalytic activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 36-43, 2014.
-

25 BINI, R. A. **Síntese e funcionalização de superfícies de óxido de ferro superparamagnéticos**. 2011. 121 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

26 ZHANG, L. L.; WANG, A. Q.; WANG, W. T.; HUANG, Y. Q.; LIU, X. Y.; MIAO, S.; LIU, J. Y.; ZHANG, T. Co-N-C catalyst for C-C coupling reactions: on the catalytic performance and active sites. **ACS Catalysis**, v. 5, p. 6563-6572, 2015.

27 SAMLAND, A. K.; SPRENGER, G. A. Microbial aldolases as C-C enzymes-unknown treasures and new developments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 253-264, 2006.

28 REVANNA, C. N.; RAGHAVENDRA, G. M.; VIJAY, T. A. J.; RANGAPPA, K. S.; BADREGOWDA, D. G.; MANTELINGU, K. Propylphosphonic anhydride-catalyzed tandem approach for Biginelli reaction starting from alcohols. **Chemical Letters**, v. 43, p. 178-180, 2013.

29 NKHILI, N. L.; REKIK, W.; MHIRI, T.; MAHMUDOV, K. T.; KOPYLOVICH, M. N.; NAILI, H. Double piperazinediium and 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octanedium M^{II} selenates ($M^{II} = Co^{II}, Ni^{II}, Cu^{II}, Zn^{II}$) as effective catalysts for Henry reaction. **Inorganica Chimica Acta**, v. 412, p. 27-31, 2014.

30 XIE, Z. B.; WANG, N.; WU, W.-X.; LE, Z.-G.; YU, X.-Q. Trypsin-catalyzed tandem reaction: one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H-ones by in situ formed acetaldehyde. **Journal of Biotechnology**, v. 170, p. 1-5, 2014.

31 XIA, W.; MA, Z.; SUN, H.; QIU, Y. Efficient, stable, and reusable Lewis acid-surfactant-combined catalyst: one-pot Biginelli and solvent-free esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 392, p. 76-82, 2014.

32 BRAUN, M. **Modern aldol reactions**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2009. 351 p.

33 FILGUEIRAS, C. A. L. Entre a batuta e o tubo de ensaio: a carreira admirável de Alexandre Borodin. **Química Nova**, v. 25, p. 1040-1049, 2002.

34 McMURRY, J. **Química orgânica**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1997. v.1, 492 p.

35 KHADJAWI, M. G.; FESKO, K. Biocatalytic methods for C-C bond formation. **ChemCatChem**, v. 5, p. 1248-1272, 2013.

36 XIE, Z.-B.; WANG, N.; JIANG, G.-F.; YU, X.-Q. Biocatalytic asymmetric aldol reaction in buffer solution. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 945-948, 2013.

-
- 37 EVANS, D. A.; POLNIASZEK, R. P.; DEVRIES, K. M.; GUINN, D. E.; MATHRE, D. J. Synthetic studies in the lysocellin family of polyether antibiotics. The total synthesis of ferensimycin B. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 20, p. 7613-7630, 1991.
- 38 OHFUNE, Y.; GRIECO, P. A.; WANG, C. L. J.; MAJETICH, G. Stereospecific total synthesis of dl-helenalin: a general route to helenanolides and ambrosanolides. **Journal of American Chemical Society**, v. 100, n. 18, p. 5946-5948, 1978.
- 39 MENG, C. Q.; NI, L.; WORSENCROFT, K. J.; YE, Z.; WEINGARTEN, M. D.; SIMPSON, J. E.; SKUDLAREK, J. W.; MARINO, E. M.; SUEN, K. L.; KUNSCH, C.; SOUDER, A.; HOWARD, R. B.; SUNDELL, C. L.; WASSERMAN, M. A.; SIKORSKI, J. A. Carboxylated, heteroaryl-substituted chalcones as inhibitors of vascular cell adhesion molecule-1 expression for use in chronic inflammatory diseases. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 50, p. 1304-1315, 2007.
- 40 CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry. Part B:** reactions and synthesis. 3rd ed. Nova York: Plenum Press, 1990. 1321 p.
- 41 MARTINS, D. L. Reações aldólicas. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 186-211, 2009.
- 42 SAITO, S.; YAMAMOTO, H. Directed aldol condensation. **Chemistry: a European Journal**, v. 7, n. 2, p. 1959-1962, 1999.
- 43 FERREIRA, M. A. B. **Síntese total da (-)goniotrionina:** estudo teórico da influência estereoeletrônica na seletividade 1,5 em reações aldólicas envolvendo β -alcoxi metilcetonas. 2012. 447 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- 44 MILNER, S. E.; MOODY, T. S.; MAGUIRE, A. R. Biocatalytic approaches to the Henry (Nitroaldol) Reaction. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 3059-3067, 2012.
- 45 BALLINI, R. The Henry (nitroaldol) reaction. In: TROST, B. M.; FLEMING, I. (Ed.). **Comprehensive organic chemistry:** selectivity, strategy and efficiency in modern organic chemistry. Oxford: Pergamon Press, 1991. v. 2, chap. 10, p. 321-340.
- 46 LUZZIO, F. A. The Henry reaction: recent examples. **Tetrahedron**, v. 57, p. 915-945, 2001.
- 47 KIM, Y. H.; YOUN, S. W. Facile synthesis of 2-nitroalkanols mediated with LiAlH_4 as catalyst. **Synlett**, n. 6, p. 880-882, 2000.
-

-
- 48 GOTOR, V.; FERNANDEZ, V. G.; BUSTO, E. Protein-mediated nitroaldol addition in aqueous media. Catalytic prosmicuity or unspecific catalysis? **Organic Process Research and Development**, v. 15, p. 236-240, 2011.
- 49 MORITA, K.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H. A tertiary phosphine-catalyzed reaction of acrylic compounds with aldehydes. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, v. 41, p. 2815, 1968.
- 50 DOUBLEDAY, C.; LI, G.; HASE, W. L. Dynamics of the biradical mediating vinylcyclopropane-cyclopentene rearrangement. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, p. 304-312, Jan. 2002.
- 51 VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LIMA JUNIOR, C. G. Morita-Baylis-Hillman adducts: biological activities and potencialities to the discovery of a new cheaper drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3954-3971, 2012.
- 52 COELHO, F.; ALMEIDA, W. P. Reação de Baylis-Hillman: uma estratégia para a preparação de intermediários multifuncionalizados para síntese orgânica. **Química Nova**, v. 23, p. 98-101, 2000.
- 53 BIGGS-HOUCK, J. E.; YOUNAI, A.; SHAW, J. T. Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 371-382, 2010.
- 54 ALVIM, H. O. H.; SILVA JÚNIOR, E. N.; SILVEIRA NETO, B. A. da. What do we know about multicomponent reactions? Mechanisms and trends for the Biginelli, Hantzsch, Mannich, Passerini and Ugi MCRs. **RSC Advances**, v. 4, p. 54282-54299, 2014.
- 55 TRON, G. C.; MINASSI, A.; APPENDINO, G. Pietro Biginelli: the man behind the reaction. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 28, p. 5541-5550, 2011.
- 56 ALVIM, H. G. O. **Efeito de líquido iônico sobre a reação de Biginelli em condições de catálise homogênea e heterogênea**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- 57 SOUZA, R. O. M. A. de; PENHA, E. T.; MILAGRE, H. M. S.; GARDEN, S. J.; ESTEVES, P. M.; ERBELIN, M. N.; ANTUNES, O. A. C. The three-component Biginelli reaction: a combined experimental and theoretical mechanistic investigation. **Chemistry: a European Journal**, v. 15, p. 9799-9804, 2009.
- 58 NARAHARI, S. R.; REGURI, B. R.; GUDAPARTHI, O.; MUKKANTI, K. Synthesis of dihydropyrimidinones via Biginelli multi-component reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 1543-1545, 2012.
-

59 SANDHU, J. S. Past, present and future of the Biginelli reaction: a critical perspective. **Arkivoc**, v. 1, p. 66-133, 2012.

60 REIS, C. **Otimização de método catalítico para a determinação de Cr(VI) com o-Diasidina, usando planejamento combinado de misturas variáveis de processo**. 1996, 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

61 PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: Edufscar, 2015. 88 p. (Apontamentos).

62 COSTA, P. R. R.; PILLI, R. A.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Substâncias carbonílicas e derivados**. Porto Alegre: Bookman, 2003. 411 p.

63 ANDREU, C.; VAREA, T.; ASENSIO, G. Inhibition of imidazolidinone formation in the aldol reactions catalyzed by zinc-prolinamide complexes. **Tetrahedron**, v. 67, p. 8705-8709, 2011.

64 BERTI, F.; BIDOGLIA, S.; BENEDETTI, F. Aldolase activity of serum albumins. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 4417-4420, 2011.

65 LE, Z. H.; GUO, L. T.; JIANG, G. F.; YANG, X. B.; LIU H. Q. Henry reaction catalyzed by lipase A from *Aspergillus niger*. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 6, n. 4, p. 277-281, 2013.

66 BALLINI, R.; BOSICA, G. Nitroaldol reaction in aqueous media: an important improvement of the Henry reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 425-427, 1997.

67 ANGELINI, T.; BALLERINI, E.; BONOLLO, S.; CURINI, M.; LANARI, D. A new sustainable protocol for the synthesis of nitroaldol derivatives via Henry reaction under solvent-free conditions. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 7, n. 1, p. 11-17, 2014.

68 GRUTTADAURIA, M.; GIACALONE, F.; MEO, P. L.; MARCULESCU, A. M.; RIELA, S.; NOTO, R. First evidence of proline acting as a bifunctional catalyst in the Baylis-Hillman reaction between alkyl vinyl ketones and aryl aldehydes. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 9, p. 1589-1596, 2008.

69 REETZ, M. T.; MONDIERE, R.; CARBALLEIRA, D. Enzyme promiscuity: first protein-catalyzed Morita-Baylis-Hillman reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 1679-1681, 2007.

70 KAPOOR, M.; MAJUMDER, A. B.; GUPTA, M. N. Promiscuous lipase-catalyzed C-C bond formation reactions between 4 nitrobenzaldehyde and 2-Cyclohexen-1-

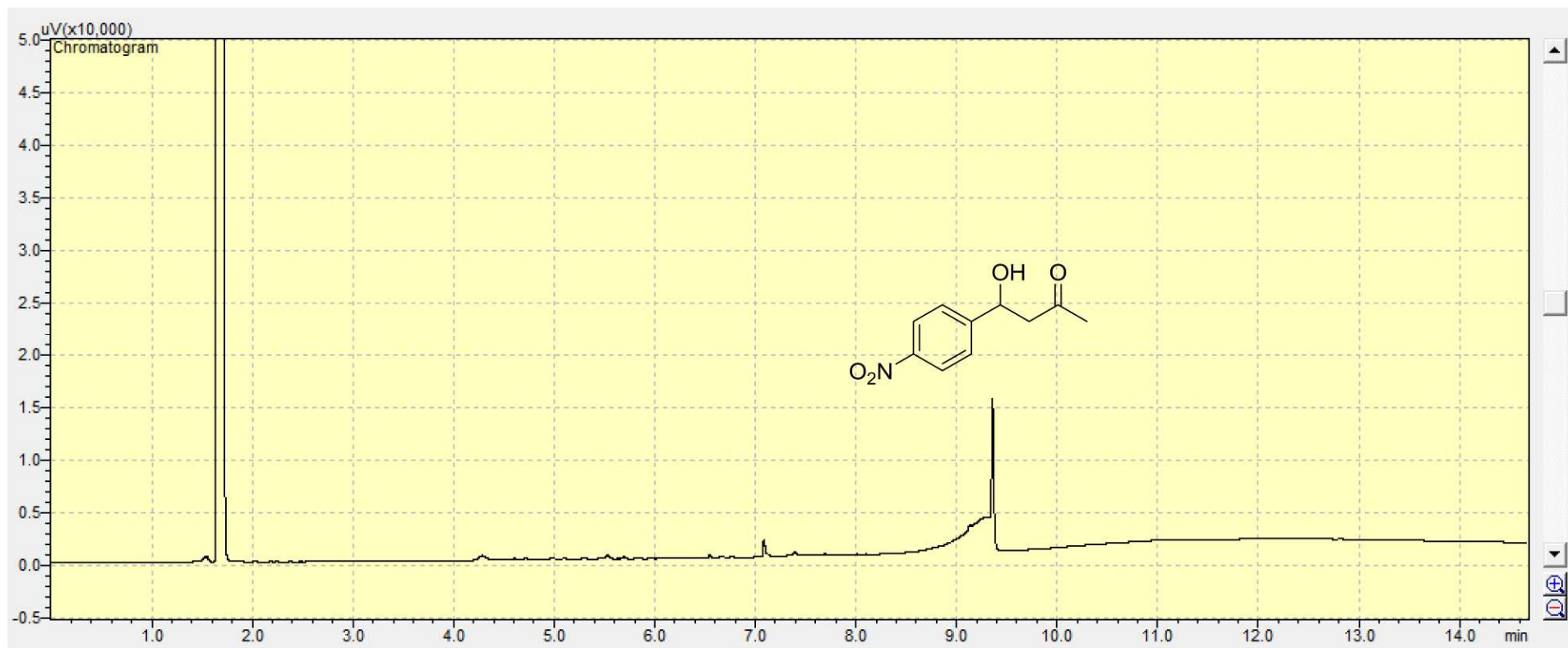
one in biphasic medium: aldol and Morita–Baylis–Hillman adduct formations. **Catalysis Letters**, v. 145, p. 527-532, 2015.

71 FOROUGHIFAR, N.; MOBINIKHALEDI, A.; RABEIE, B.; JALILI, L. DABCO as a mild efficient catalyst for the synthesis of tetrahydropyrimidines. **Revue Roumaine de Chemie**, v. 58, n. 6, p. 491-495, 2013.

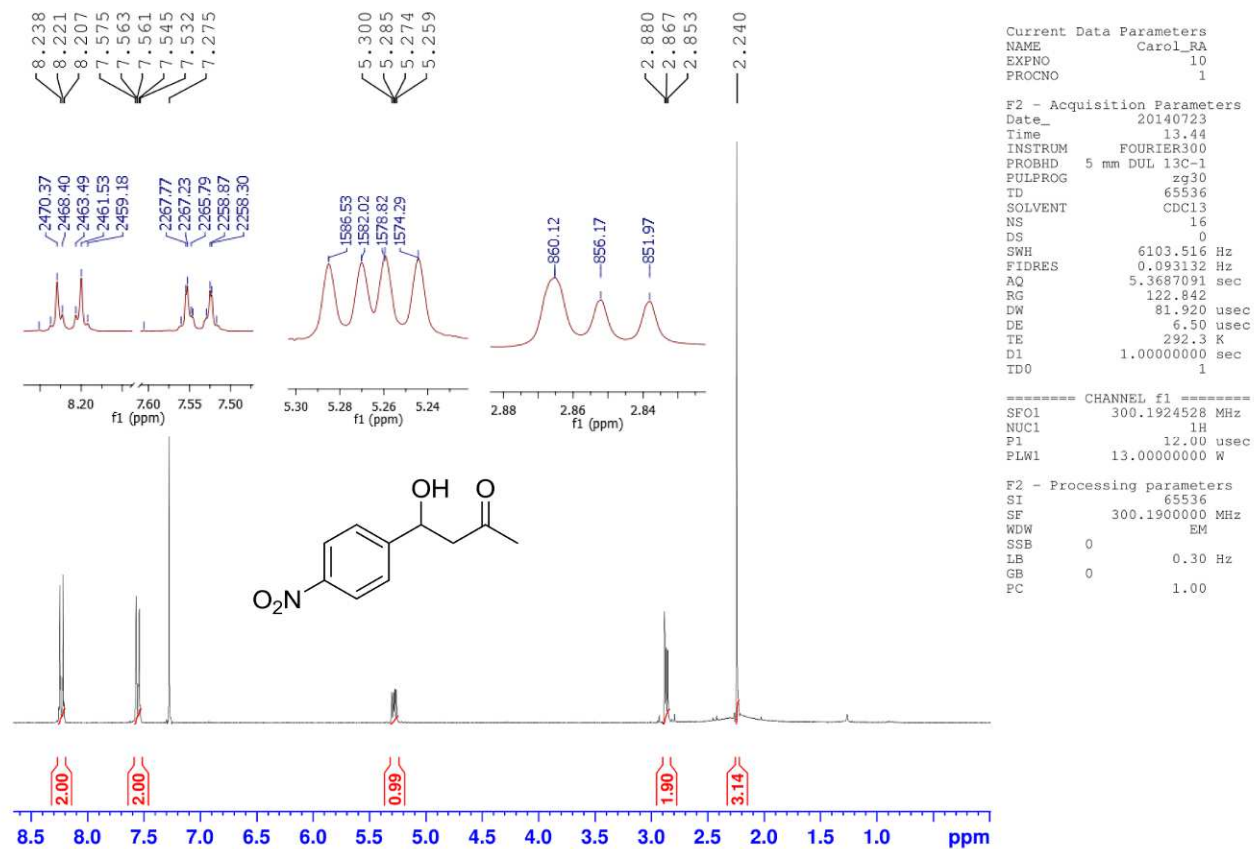
72 SHAABANI, A.; BAZGIR, A.; TEIMOURI, F. Ammonium chloride-catalyzed one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 857-859, 2003.

73 SHARMA, U. K.; SHARMA, N.; KUMAR, R.; SINHA, A. K. Biocatalyst for multicomponent Biginelli reaction: bovine serum albumin triggered waste-free synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones. **Amino Acids**, v. 44, p. 1031-1037, 2012.

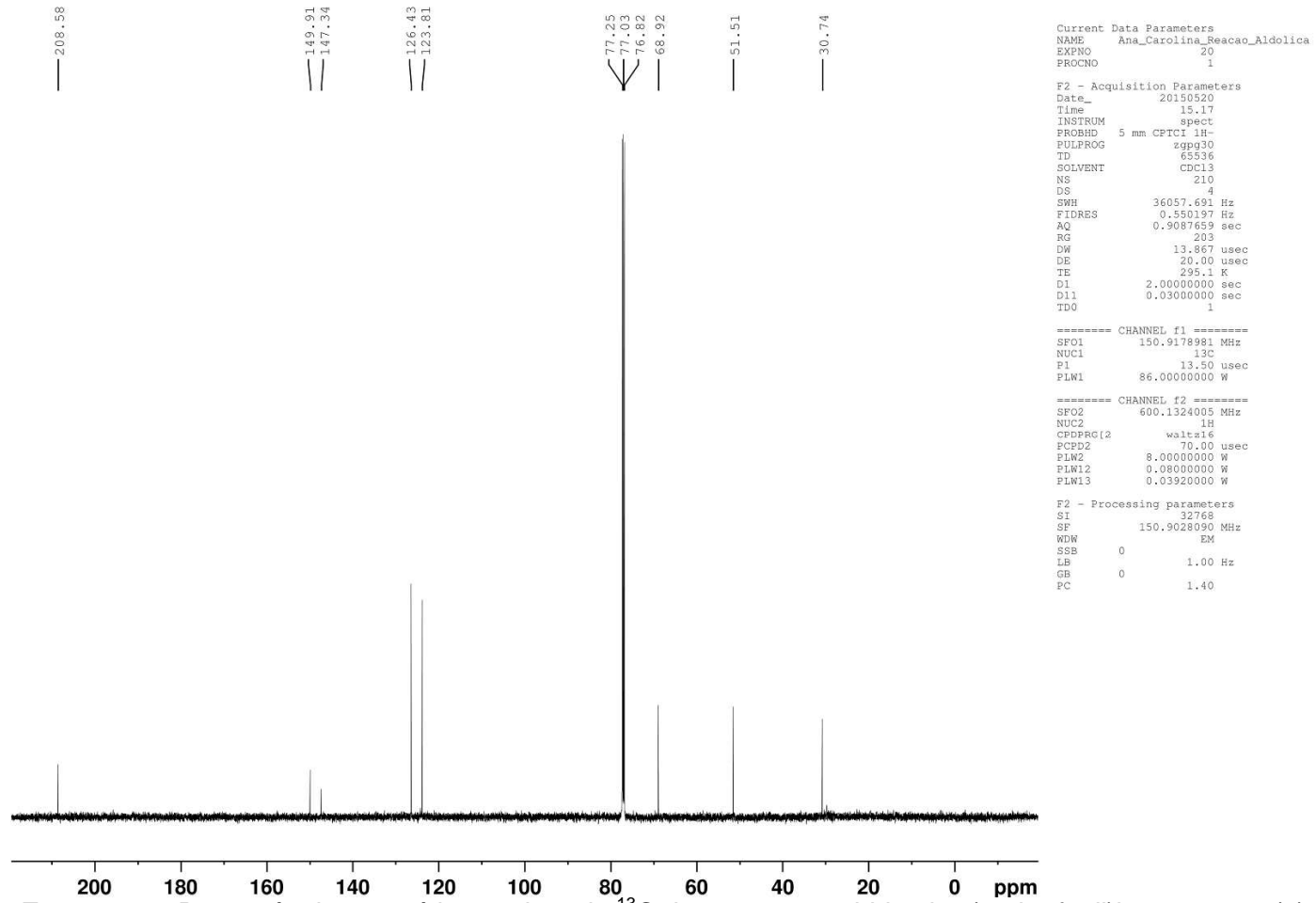
Apêndice



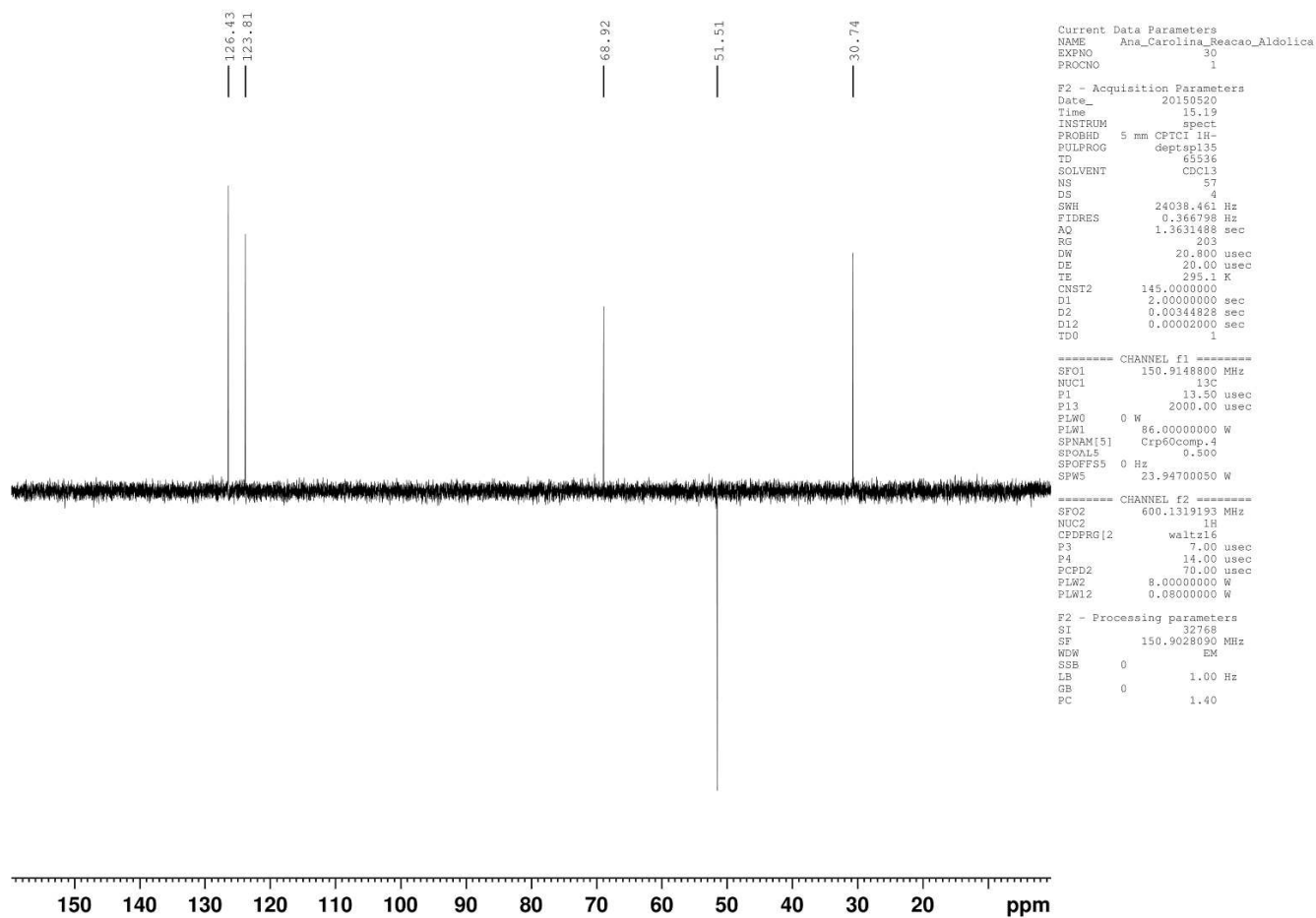
Cromatograma 1. Reação aldólica



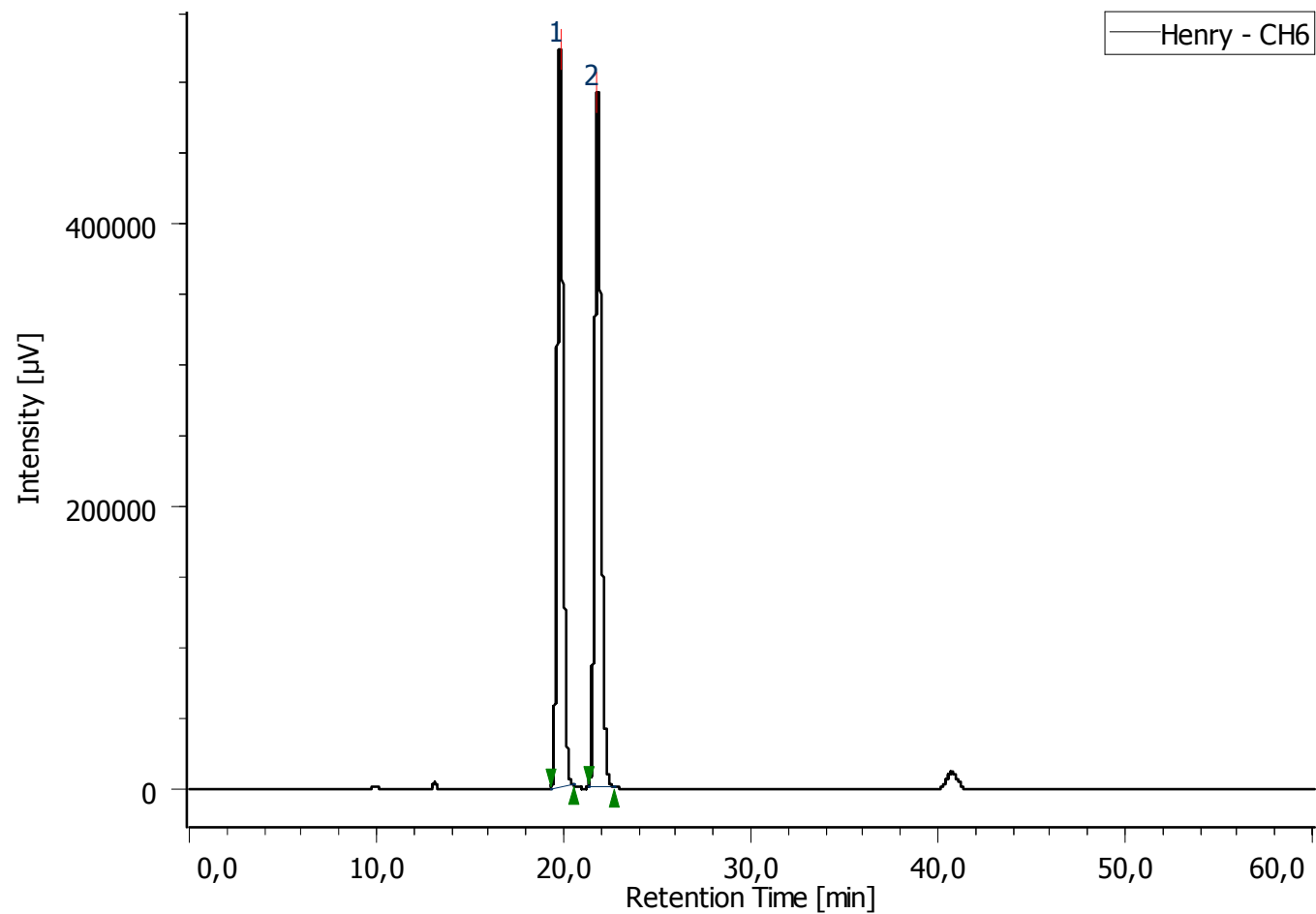
Espectro 1. Ressonância magnética nuclear de ^1H do composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)butan-2-ona (2).



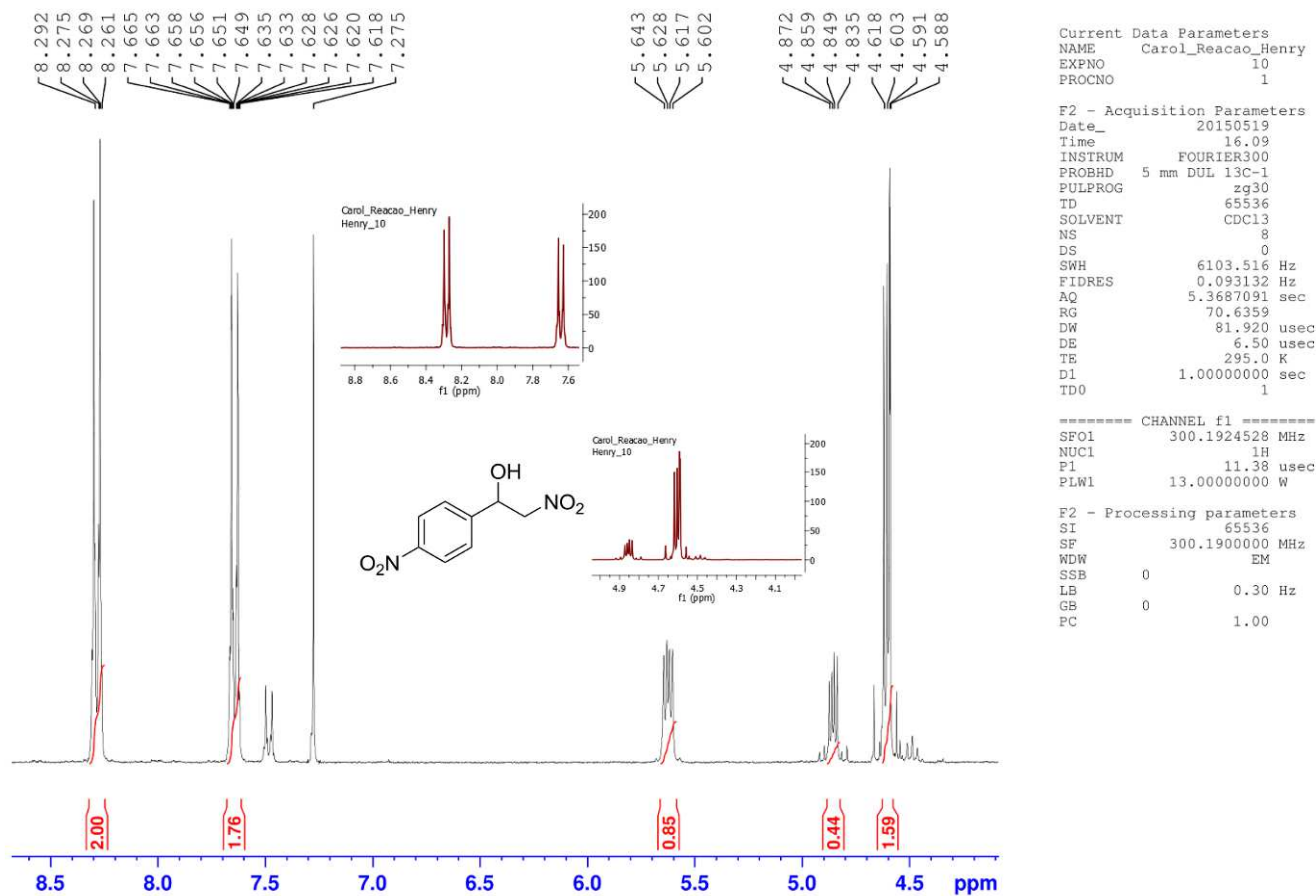
Espectro 2. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C do composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)butan-2-ona (2).



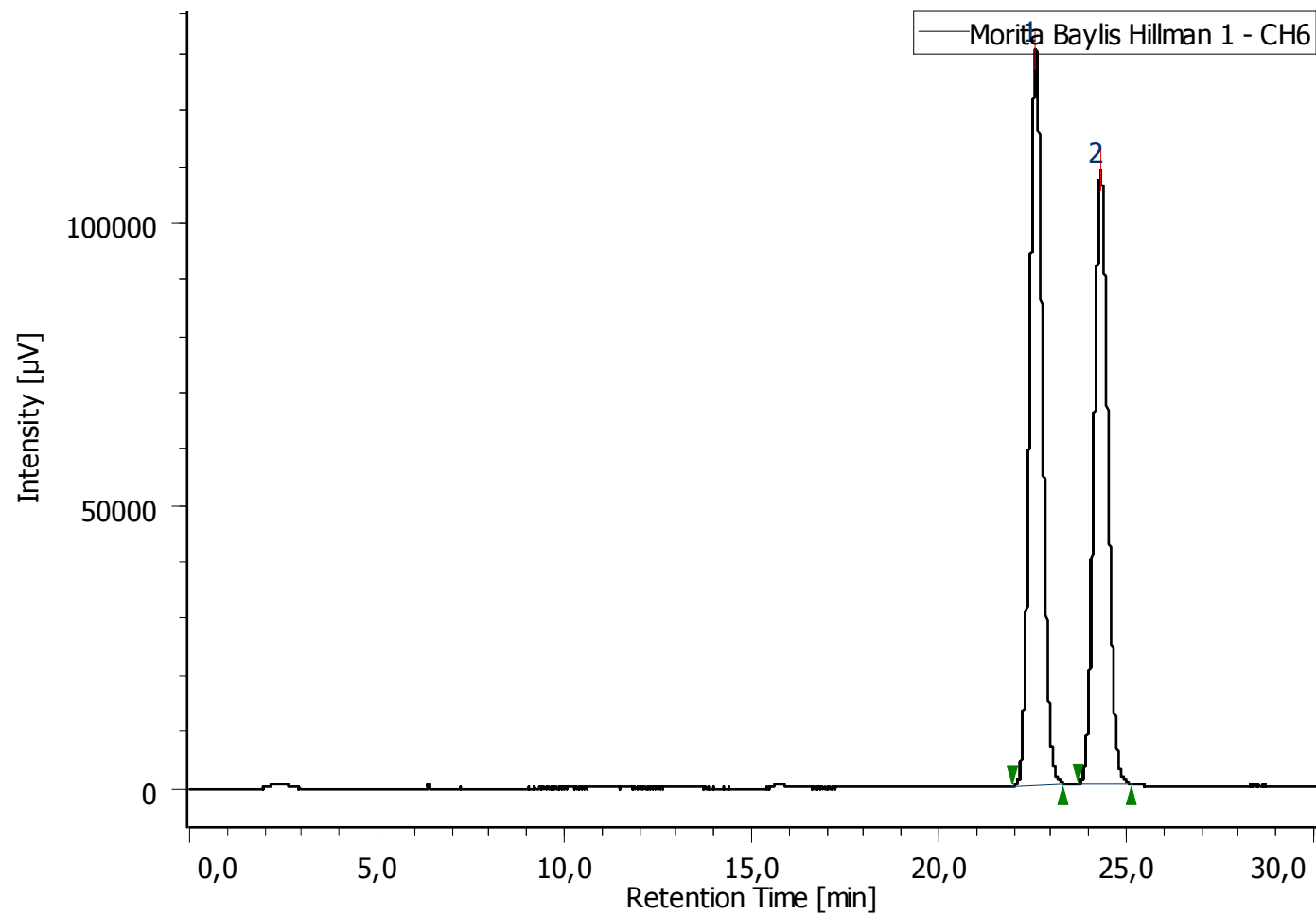
Espectro 3. Experimento de DEPT do composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)butan-2-ona (2).



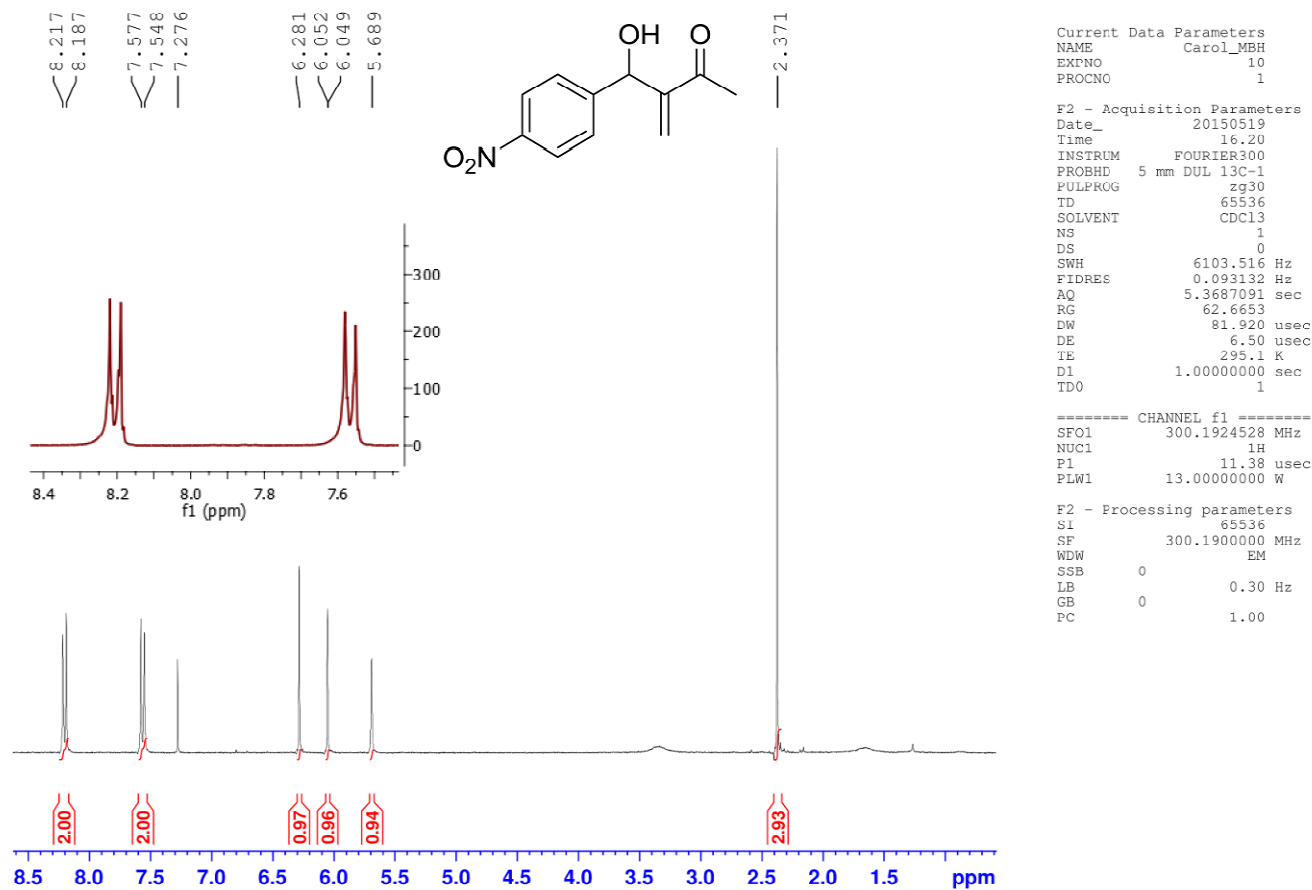
Cromatograma 2. Excesso enantiomérico padrão para o produto 1-nitro-2-hidroxi-2-(4-nitrofenil)-etanol (**3**).



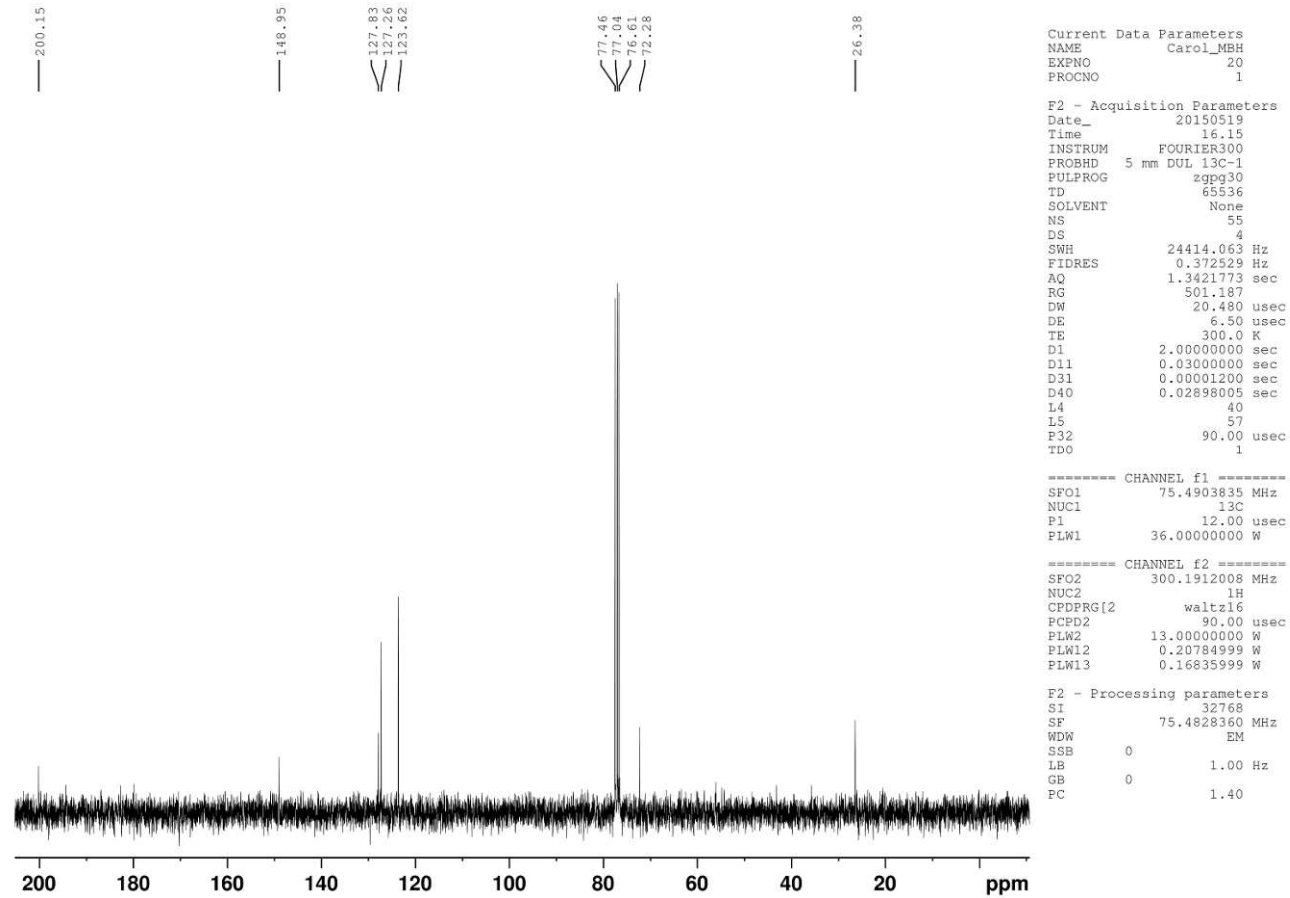
Espectro 4. Ressonância magnética nuclear de ^1H do composto 1-nitro-2-hidroxi-2-(4-nitrofenil)-etanol (3).



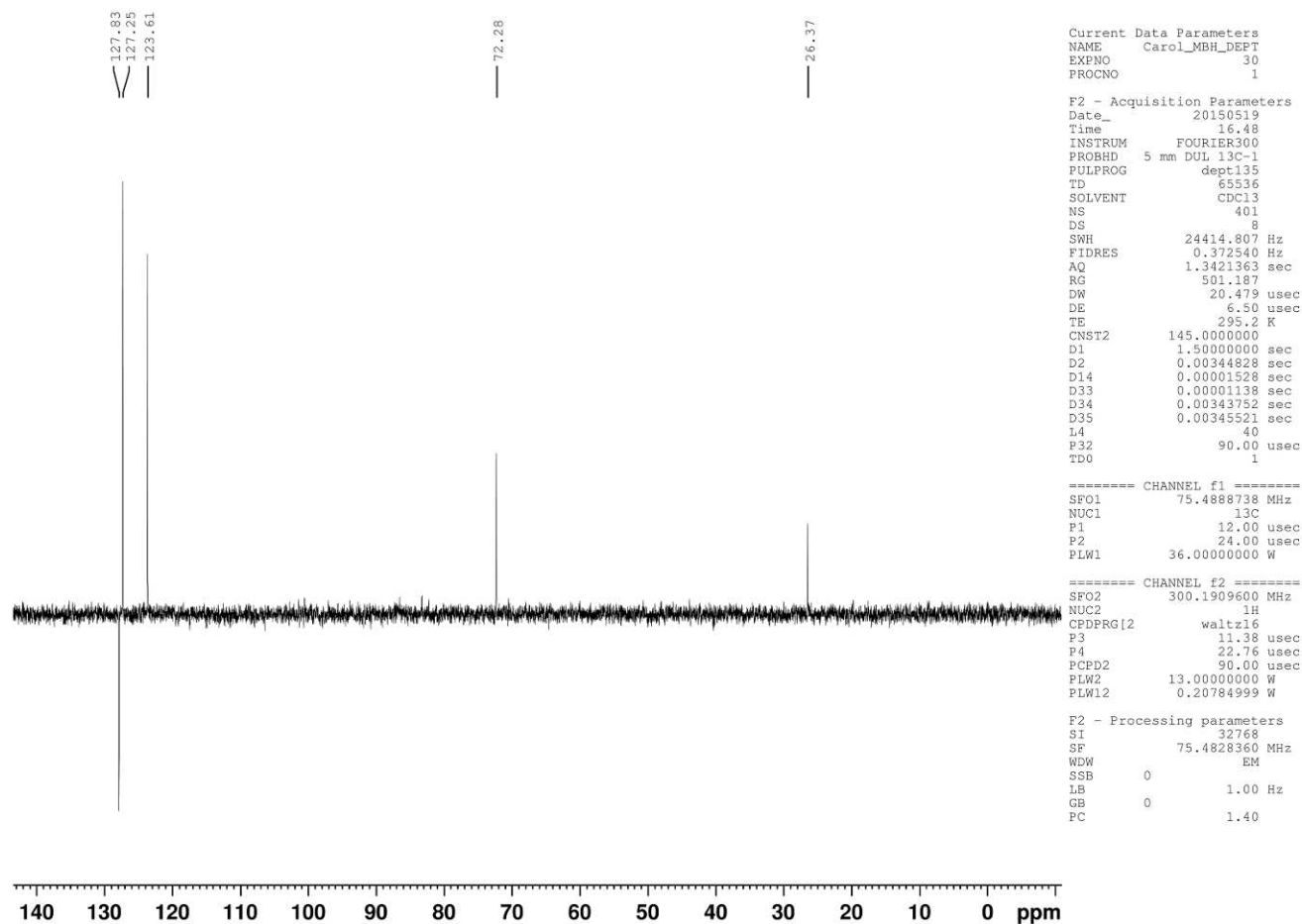
Cromatograma 3. Excesso enantiomérico padrão para o produto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)-3-metileno-butan-2-ona (5).



Espectro 5. Ressonância magnética nuclear de ^1H do composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)-3-metileno-butan-2-ona (**5**).



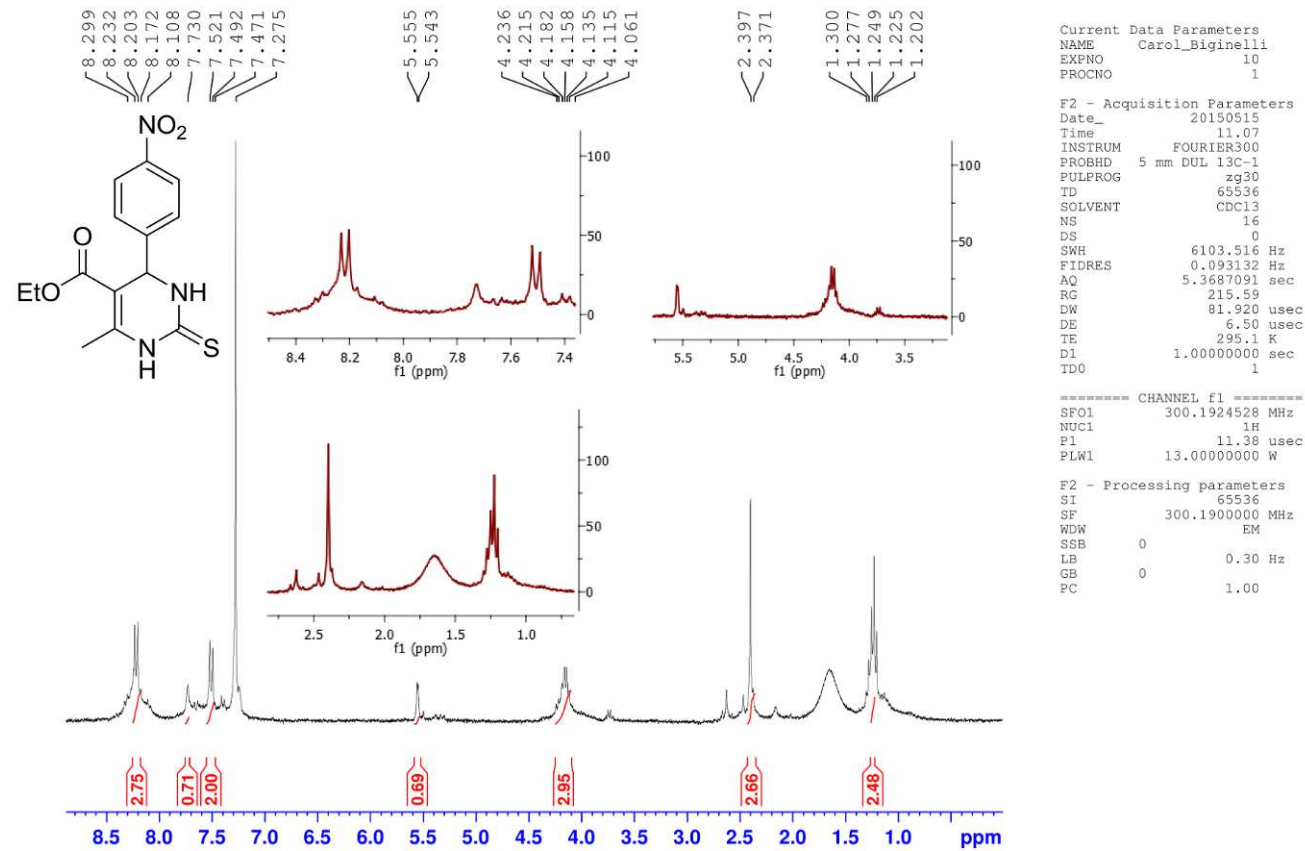
Espectro 6. Ressonância magnética nuclear de ¹³C do composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)-3-metileno-butan-2-ona (5).



Espectro 7. Experimento de DEPT para o composto 4-hidroxi-4-(4-nitrofenil)-3-metileno-butan-2-ona (5).



Cromatograma 4. Reação de Biginelli.



Espectro 8. Ressonância magnética nuclear de ¹H do composto 1,2,3,4-tetrahidro-6-metil-4-(4-nitrofenil)-2-tioxopirimidina-5-carboxilato de etila (4)