

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS-UFGD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE
REDE PRÓ-CENTRO - OESTE
LABORATÓRIO DE CATÁLISE ORGÂNICA E BIOCATÁLISE-LACOB

TÁBATA BRANQUINHO DE ALBUQUERQUE

SÍNTESE E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTITUMORAL DE COMPOSTOS *N,S*-ACETAIS
UTILIZANDO BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS

TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

DOURADOS/MS

2021

TÁBATA BRANQUINHO DE ALBUQUERQUE

**SÍNTESE E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTITUMORAL DE COMPOSTOS N,S-ACETAIS
UTILIZANDO BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biotecnologia e Biodiversidade

Orientador(a): Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira

DOURADOS/MS

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A345s Albuquerque, Tábata Branquinho De
SÍNTESE E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE
COMPOSTOS N,S-ACETAIS UTILIZANDO BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS [recurso
eletrônico] / Tábata Branquinho De Albuquerque. -- 2021.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: NELSON LUÍS DE CAMPOS DOMINGUES.

Coorientador: Paulo Sérgio Pereira.

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande
Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. enzima. 2. fluxo contínuo. 3. N,S-acetais. I. Domingues, Nelson Luís De Campos. II. Pereira,
Paulo Sérgio. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"SÍNTESE E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTITUMORAL DE COMPOSTOS N,S ACETAIS UTILIZANDO
BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS"

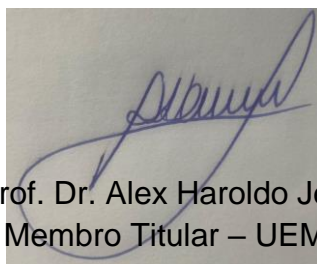
Por

TÁBATA BRANQUINHO DE ALBUQUERQUE

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biotecnologia e Biodiversidade



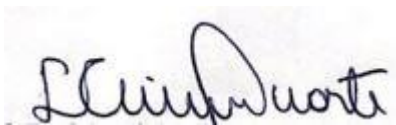
Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues
Orientador/Presidente – UFGD



Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller
Membro Titular – UEMS



Prof. Dr. George Brand
Membro Titular – UEMS



Prof.ª Dr.ª Letícia Castellani Duarte
Membro Titular – UNIGRAN



Prof. Dr. Leonardo Ribeiro Martins
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 05 de abril de 2021.

**AOS MEUS PAIS, PELO AMOR INCONDICIONAL,
AOS MEUS AMIGOS QUE SEMPRE ME APOIARAM, E
ÀQUELES QUE DUVIDARAM DE MIM!**

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o grande maestro da vida, que sempre nos conduz por caminhos que muitas vezes não entendemos, mas que nos levam a felicidade. Pela trajetória que percorri até o momento, teve dias que eu pensei em desistir, mas meu Deus foi maior. Ele que é o autor da vida, meu eterno agradecimento. À Nossa Senhora, por toda a intersecção e amor de mãe que nos dá todos os dias.

Agradeço imensamente a meu querido pai, Valdemir, por ser minha base, meu alicerce, minha referência de força e independência e por ter sempre me apoiado, e a minha mãe, Nuédja, pelo apoio, compreensão e dedicação, que mesmo diante de todas as adversidades e conflitos, jamais deixaram de me apoiar, e acima de tudo, de me amar, a quem dedico cada passo de minha vida, e essa tese em especial. Ao meu irmão (Pábulo) e a minha neném, sobrinha que amo (Lorrayne).

Ao meu prof Dr. Nelson Luís, pela orientação, sugestões, pela confiança depositada. Obrigada pelo ensinamento de anos e como foram anos, longos anos rrsrs, A velha frase: eu te tirei do lamaçal da ignorância... hahah. Você quer que eu te fale como pipoqueiro, como seu orientador.... Sou eternamente grata... pela orientação e amizade construída ao longo de todos esses anos. Meus agradecimentos pelo conhecimento adquirido, pelas experiências obtidas, pelo laço fraterno, pelo apoio em cada momento, e por todas as situações vivenciadas, me ensinando sempre algo novo em cada uma delas. Por todo apoio, incentivo e confiança em mim depositados.

As minhas amigas Beatriz Fuzinato (Fuzi) e Beatriz Amaral (BEA), que mesmo diante das transformações que nos acompanharam ao longo desses anos, jamais deixaram de estar presente, fazendo valer o real sentido da palavra amizade. Sei que não fui tão tão legal, mas sempre quis e quero o bem de vocês e que possam daqui para frente brilhar e brilhar, sucesso na vida de vocês, sou eternamente grata.

Aos companheiros de laboratório: João Paulo (JP), José, Mateus.

Àquelas que já não fazem mais parte do convívio diário desse laboratório, mas que permanecem minhas amigas de coração: Caren Galeano e Criscieli Ferro.

Aos membros da banca, pela presença e apoio, e à UFGD.

Muito Obrigada!

*“Nenhuma barreira é intransponível,
ao se tomar como ponto de partida a fé em si próprio.”*

Sartre

RESUMO

ALBUQUERQUE, Tábata Branquinho de. Universidade Federal da Grande Dourados, abril de 2021. “**Síntese e estudo da atividade antioxidante e antitumoral de compostos *N,S*-acetais utilizando biocatalisadores enzimáticos**”. Orientador: Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues. Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira.

A pesquisa em Biocatálise cresceu exponencialmente nas últimas décadas devido a descobertas relacionadas à síntese de muitos compostos, principalmente aqueles com propriedades biológicas, que são benéficas para a sociedade. Além disso, as preocupações ambientais têm conduzido muitos grupos de pesquisa em todo o mundo, e até mesmo indústrias, a descrever novos protocolos sintéticos que não são prejudiciais para o ambiente e considerar os subprodutos formados por reações. Isso resulta no uso de catalisadores que permitem reações com maior rapidez usando reagentes de baixo custo e evita o desperdício de solventes, que têm grande impacto no fator ambiental. Nesse sentido, o uso de enzimas possui ótimas características catalíticas como alta eficiência e biodegradação (ao contrário de metais pesados); e em alguns casos, as transformações químicas utilizando enzimas ocorrem no meio aquoso, evitando o uso de solventes poluentes. Muitos exemplos de reações enzimáticas foram descritas na literatura, e tendo em vista a necessidade de sintetizar compostos de uma maneira mais “verde”, surge o interesse em estabelecer uma metodologia sintética para os *N,S*-acetais, que são comumente encontrados em uma ampla gama de produtos biológicos com aplicações médicas e bioquímicas. No entanto, até onde sabemos, nenhum outro procedimento foi descrito para a síntese de *N,S*-acetais usando catalisadores biológicos, como enzimas, a não ser o trabalho reportado pelo próprio nosso grupo de pesquisa. Além disso, os pesquisadores buscam em reatores uma inovação metodológica, sendo estes mais verdes e fáceis de manusear. Assim, neste trabalho foi proposto o emprego de enzimas na síntese de alguns *N,S*-acetais sob condições reacionais brandas, além de apresentarmos um projeto de reator enzimático baseado na química de fluxo contínuo aplicada na síntese de *N,S*-acetal. Neste estudo, comprovamos que a imobilização da enzima LPP (Lipase do pâncreas de porco) foi eficaz e satisfatória, sendo possível reutilizá-la em demais ciclos. Os métodos estabelecidos utilizando tanto enzimas livres quanto imobilizadas mostraram-se ser tolerantes tanto para o tiol quanto para a amidossulfona, proporcionando altos rendimentos em um curto tempo de reação. Além do mais, os *N,S*-acetais foram avaliados para determinar sua propriedade antioxidante e o potencial antitumoral contra as linhas celulares de melanoma SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-103 e B16F10-Nex2, e resultados gratificantes foram obtidos com estes ensaios. A linhagem SK-MEL-19 apresentou no composto 2 e 48Hs 56% de seletividade, já para SK-MEL-28 o composto 1 apresentou 74% de seletividade, já para SK-MEL-103 o composto 1 apresenta maior seletividade em 24 Hs. E nas linhagem B16F10-Nex2 todos os compostos testados apresentaram menor IC50 e uma maior seletividade.

Palavras-chave: enzima, fluxo contínuo, *N,S*-acetais

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Tábata Branquinho de. Federal University of Grande Dourados, April 2021. **"Synthesis and study of the antioxidant and antitumor activity of *N,S*-acetal compounds using enzymatic biocatalysts"**. Advisor: Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues. Co-adviser: Paulo Sérgio Pereira.

Biocatalysis research has grown exponentially in recent decades due to discoveries related to the synthesis of many compounds, mainly those with biological properties, which are beneficial to society. In addition, environmental concerns have led many research groups around the world, and even industries, to describe new synthetic protocols that are not harmful to the environment and to consider the byproducts formed by reactions. Thus, the use of catalysts allows reactions more quickly using low-cost reagents and avoids the waste of solvents, which have a great impact on the environmental factor. In this sense, the use of enzymes has excellent catalytic characteristics such as high efficiency and biodegradation (instead of heavy metals); and in some cases, chemical transformations using enzymes occur in the aqueous medium, avoiding the use of polluting solvents. Many examples of enzymatic reactions have been described in the literature, and in view of the need to synthesize compounds in a more "green" way, interest arises in establishing a synthetic methodology for *N,S*-acetals, which are commonly found in a wide range of biological products with medical and biochemical applications. However, as far as we know, no other procedure has been described for the synthesis of *N,S*-acetals using biological catalysts, such as enzymes, other than the work reported by our own research group. In addition, the researchers are looking for a methodological innovation in reactors, which are greener and easier to handle. Thus, in this work, we proposed to use enzymes in the synthesis of some *N,S*-acetals under mild reaction conditions, besides to presenting an enzymatic reactor project based on the continuous flow chemistry applied in the synthesis of *N,S*-acetal. In this study, we proved that the LPP enzyme immobilization was effective and satisfactory and it was possible to reuse it in other cycles. The methods established using both free and immobilized enzymes proved to be tolerant for both thiol and amidosulfone, getting high yields in a short reaction time. In addition, *N,S*-acetals were evaluated to determine their antioxidant property and antitumor potential against the SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-103 and B16F10-Nex2 melanoma cell lines, and gratifying results were obtained with these assays.

Keywords: enzyme, continuous flow, *N,S*-acetals

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Classificação das enzimas e suas funções catalíticas segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB). ⁴² | 21 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação esquemática de uma interação enzima-substrato e sua catálise (E = enzima, S = substrato, P = produto). | 22 |
| Figura 2. Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por enzimas. ⁵³ ... | 23 |
| Figura 3. Diferentes nucleófilos aplicáveis às reações mediadas por lipases..... | 25 |
| Figura 4. Métodos para imobilização de enzimas. ⁸⁰ | 30 |
| Figura 5. Zonas de uma configuração padrão de fluxo e as respectivas unidades que compõem um sistema contínuo. ¹⁰² | 35 |
| Figura 6. Diagrama simplificado dos principais componentes de um sistema em fluxo contínuo utilizado em síntese orgânica. ¹⁰⁷ | 36 |
| Figura 7. Principais moléculas biológicas contendo <i>N,S</i> -acetais..... | 38 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Reação de tio-Michael usando LPP como biocatalisador. ¹⁵ | 26 |
| Esquema 2. Síntese de compostos β -aminocetônicos..... | 28 |
| Esquema 3. Metodologia descrita por Antilla e colaboradores para a síntese de <i>N,S</i> -acetais.. | 39 |
| Esquema 4. Adição de tióis a iminas catalisada por derivados de tioureia. | 39 |
| Esquema 5. Metodologia descrita por Wang e colaboradores para a síntese de <i>N,S</i> -acetais. .. | 40 |
| Esquema 6. Metodologia descrita por Oliveira e colaboradores para a síntese de <i>N,S</i> -acetais. | 40 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| EPA | Environmental Protection Agency |
| kDa | quilo Dalton |
| IUB | União Internacional de Bioquímica |
| IUBMB | União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular |
| LPP | lipase de pâncreas de porco |
| U.S. | ultrassom |
| Da | Dalton |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GRAS | Generally Regarded as Safe |
| UV-vis | ultravioleta visível |
| IFA | insumo farmacêutico ativo |
| HIV-1 | Human immunodeficiency virus 1 |
| PMP | éter <i>p</i> -metóxfenil |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 2.1 <i>Biocatálise</i> | 16 |
| 2.2 <i>Química Verde</i> | 18 |
| 2.3 <i>Enzimas</i> | 20 |
| 2.3.1 <i>Lipases</i> | 24 |
| 2.3.2 <i>Quimosina</i> | 26 |
| 2.3.3 <i>Albumina</i> | 28 |
| 2.4 <i>Imobilização de enzimas</i> | 28 |
| 2.5 <i>Métodos de imobilização</i> | 30 |
| 2.5.1 <i>Adsorção</i> | 30 |
| 2.5.2 <i>Encapsulação</i> | 31 |
| 2.5.3 <i>Ligação covalente</i> | 32 |
| 2.6 <i>Química em Fluxo</i> | 33 |
| 2.7 <i>Síntese de compostos N,S-acetais</i> | 37 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 41 |
| 4. OBJETIVOS..... | 42 |
| 4.1 <i>Objetivo Geral</i> | 42 |
| 4.2 <i>Objetivos Específicos</i> | 42 |
| 5. CONCLUSÃO | 59 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 60 |

1. INTRODUÇÃO

A demanda para obtenção de novos produtos químicos pela indústria e na academia têm provocado um aumento simultâneo na geração de subprodutos tóxicos, os quais causam impactos negativos ao meio ambiente. Em consequência, os aspectos ligados às questões ambientais têm recebido grande atenção, gerando um movimento que busca remodelar os trabalhos tecno-científicos, aplicando metodologias menos impactantes aos ecossistemas.¹ Neste contexto, surge o conceito de desenvolvimento sustentável, definido como a “capacidade de satisfazer as necessidades da geração atual sem comprometer as gerações futuras”. Este conceito compreende o desenvolvimento econômico e ambiental de uma forma sustentável, visando a manutenção e melhoria da qualidade de vida global.

Neste cenário, uma nova conduta pode ser inserida na área da química, fundada nos princípios de Química Sustentável ou Química Verde.² A Química Verde tem como principal paradigma a redução e/ou processos que eliminem o uso de materiais tóxicos já durante o planejamento sintético. Essa abordagem é de suma importância para a diminuição dos impactos ambientais e gestão de materiais que sejam menos tóxicos e de período longo de vida.³

A Química Verde instiga uma produção mais limpa e com menos poluentes industriais, garantindo que os fabricantes assumam uma maior responsabilidade para com os produtos produzidos nesse setor. Além disso traz uma abordagem de prevenção, uma vez que visa a redução de riscos causados e, também objetiva o desenvolvimento de metodologias que substituam estes compostos tóxicos por substâncias ambientalmente benéficas e de fácil manuseio.⁴

Entre estes princípios dispostos pela Química Verde está a realização de reações químicas através de catalisadores, os quais levem à produção de compostos orgânicos de maneira eficiente pautando-se na economia atômica e seletiva e reduzindo a formação de subprodutos indesejáveis. Neste contexto, o conhecimento do fenômeno catalítico é cada vez mais relevante para o melhor controle da reação. Dentre os diversos catalisadores que podem ser usados, os biocatalisadores ganham destaque, pois são capazes de elevar consideravelmente a velocidade das reações, requerem condições brandas e, em alguns casos, catalisam reações de síntese e degradação e podem apresentar seletividade quanto ao tipo de reação. Apesar de ser uma área de pesquisa já consolidada, a importância da catálise se renova constantemente na indústria e na academia. Nesse contexto, o uso de biocatalisadores permite reações altamente seletivas, evitam a formação de resíduos e permitem sua reutilização, ocasionando benefícios econômicos e ambientais nos processos químicos.^{5,6}

Tradicionalmente, as reações são realizadas em etapas, nas quais os reagentes são transformados, passo-a-passo, em produtos, normalmente sendo extraídos e purificados por métodos dispendiosos a cada etapa. Neste sentido, a síntese em fluxo contínuo ganha destaque, pois apresenta diversas vantagens, tais como a diminuição da utilização de solventes, diminuição ou eliminação de processos de extração e purificação, utilização mais segura de altas temperaturas, e aumento da eficiência em processos interfaciais, como transferência de calor. Devido às vantagens apresentadas, as reações em fluxo contínuo já são realidade nas indústrias farmacêuticas, e vêm ganhando cada vez mais espaço na indústria química em geral.⁷ Além disso, compostos e intermediários instáveis representam um grande desafio em metodologias sintéticas, e métodos de síntese em fluxo contínuo têm contribuído muito nessa área, abrindo caminhos e perspectivas para a exploração destes compostos.⁸

Tendo em vista o contexto ambiental no qual a Biocatálise está inserida, o uso de enzimas ganha destaque como catalisador nas reações químicas. Desta forma, aplicando estes biocatalisadores nas indústrias torna-se ainda mais possível o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza e sem causar riscos ambientais. Sendo assim, as enzimas compõem um grupo de biocatalisadores ideais, sendo as principais responsáveis pelo contínuo desenvolvimento da biocatálise, área que tem se estabelecido como ambientalmente viável para a síntese de compostos orgânicos nos últimos dez anos.⁹

Embora as enzimas sejam catalisadores de reações que ocorrem em sistemas biológicos, as mesmas podem atuar como substratos não-naturais fora de seu sistema bioquímico considerados xenobióticos.¹⁰ Estes catalisadores podem ser encontrados em diversas fontes renováveis, como plantas, vegetais, microrganismos ou até mesmo sintéticas.¹¹

O uso de enzimas como catalisadores em reações orgânicas vem de encontro ao desafio de maximização dos processos associado à diminuição dos impactos ambientais, seja nos setores acadêmicos ou industriais, consolidando a biocatálise como área essencial para a produção de compostos de valor e atividades agregadas. As vantagens sintéticas das enzimas há muito tempo são reconhecidas, sendo elas: seu potencial para controle -regio e quimiosseletivo, particularmente ao ativar moléculas complexas funcionalizadas ou com andaimes e grupos funcionais que não podem suportar condições de reação severas. Ademais, oferecem biodegradabilidade inerente, oferecendo assim uma opção que vale ser explorada.¹²

Um dos caminhos promissores da Biocatálise é a imobilização de enzimas, sendo esta preferível em reações bioquímicas, porque geralmente aumenta sua estabilidade e, na maioria dos acontecimentos, enzimas imobilizadas podem permitir uma recuperação e reutilização mais acessível, bem como sua incorporação em reações de fluxo.¹³

Desse modo, várias enzimas têm sido empregadas nas reações orgânicas, tais como, em reações aldólicas,¹⁴ adição de Michael,¹⁵ Morita Bayllis-Hillman,¹⁶ entre outras. Além disso, outra classe de compostos que tem recebido atenção são os *N,S*-acetais, pois estão presentes em uma ampla variedade de produtos biológicos com aplicações farmacológicas e bioquímicas.

Atualmente, essa classe de compostos, tais como a penicilina, pertencente à classe da família de antibióticos β -lactâmicos, representados por uma opção terapêutica no tratamento e na prevenção de diferentes processos infecciosos e de suas complicações.¹⁷ Os *N,S*-acetais também constituem antibióticos de elevada eficácia e de baixo custo, como a Fusaperazina A, e outros vários produtos naturais, utilizados como antiviral, agente bactericida e antitumoral. Ao longo de vários anos, inúmeras estratégias sintéticas de *N,S*- acetais de moléculas quirais vem sendo desenvolvidas. Entre tantas metodologias para a síntese de *N,S*-acetais, diversos procedimentos apresentam tempos reacionais bastante elevados, dificuldades de separação do catalisador e reutilização do mesmo.¹⁸

Assim, devido ao potencial biológico dos *N,S*-acetais, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia que permite a utilização de precursores de fácil acesso. Nesse contexto, a inserção de nucleófilos de enxofre à substratos insaturados como iminas, destaca-se como um procedimento viável e eficiente para obtenção dos *N,S*-acetais. Através da adição 1,2 de tióis à diferentes iminas, uma vasta gama de produtos podem ser alcançados em um procedimento sob condições reacionais mais suaves.¹⁹

Tendo isso em vista, propôs-se neste trabalho a inserção de enzimas como biocatalisadores visando sintetizar alguns compostos *N,S*-acetais em condições reacionais brandas, bem como a aplicação de enzima imobilizada em reações em fluxo contínuo, sendo que os compostos *N,S*-acetais sintetizados foram também avaliados para determinar sua propriedade antioxidante e o potencial antitumoral contra as linhas celulares de melanoma.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocatálise

A Biocatálise abrange processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato orgânico em um produto que tenha alguma aplicação com um número limitado de etapas.²⁰

Esta técnica vem ganhando atenção decorrente de alguns fatores como:²⁰

- As transformações químicas tradicionais empregam solventes e até mesmo alguns reagentes nocivos ao meio ambiente;
- A biocatálise promove produtos com alto grau de quimio-, regio- e estereosseletividade em condições reacionais muito brandas;
- Reações biocatalisadas são aceleradas na ordem de $10^8 - 10^9$ em relação as mesmas reações catalisadas quimicamente;
- Os catalisadores empregados em biotransformações são biodegradáveis e auxiliam na redução do custo de produção;
- Tecnologia importante para a síntese de compostos químicos quirais com alto valor agregado.

Em virtude de oferecer uma alternativa ambientalmente correta em relação a síntese orgânica conduzida por vias clássicas, a Biocatálise vem sendo especialmente utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica, onde a alta seletividade das reações é importante. Vários compostos de interesse industrial são obtidos a partir de reações utilizando a Biocatálise, sendo esse ramo uma ativa área de pesquisa. Por exemplo o desenvolvimento de novas drogas e agrotóxicos que é bem reconhecido e, uma variedade de enzimas já são comumente utilizadas em processos industriais, podemos citar também os processos de síntese dos fármacos, (1R, 2S)- efedrina com atividade β -adrenérgico mediado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e dos antibióticos ampicilina, amoxicilina, cefalexina e cefadroxil, utilizando-se a enzima Penicilina²¹

O domínio interdisciplinar da Biocatálise encontra-se atualmente em amplo e contínuo desenvolvimento. Biocatalisadores ou catalisadores biológicos são biomoléculas, cuja principal função é catalisar reações. São amplamente utilizados em química orgânica para processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas, se destacam: elevada velocidade de reação, utilização de condições brandas, compatibilidade com substratos sintéticos, e ainda podem apresentar enantio- e regiosseletividade nos produtos de interesse.²¹

Assim, a Biocatálise está totalmente inserida nos conceitos de “Química Verde” que surgiram a partir dos anos 90.^{22,23}

Ao longo dos anos houve um aumento sobre o interesse na utilização de enzimas como biocatalisadores industriais na síntese orgânica, particularmente na produção de compostos quirais. Nos casos no qual o desenvolvimento de uma transformação catalisada por uma enzima leva a uma viável aplicação em grande escala, o resultado bem sucedido vem de um esforço conjunto entre a pesquisa acadêmica e a indústria.²²

A área de Biocatálise surgiu como uma ferramenta poderosa para a chamada “química ecologicamente correta” ou *green chemistry*, a qual levará cada vez mais a processos industriais comprometidos com o controle ambiental.²⁴ Assim sendo, a Biocatálise consiste em uma ferramenta muito importante na obtenção de compostos ativos, uma vez que muitas enzimas apresentam atividade frente a substratos não-naturais e em solventes orgânicos, e estão sendo amplamente utilizadas em transformações sintéticas.²⁵ Embora a parte “bio” da Biocatálise a torne ambientalmente amigável, é a parte “catálise” que fornece as vantagens estabelecidas pelos parâmetros impostos pela Química Verde.²⁶

A Biocatálise é uma área de grande mérito na transformação de produtos naturais ou sintéticos, representando uma extensão das rotas clássicas de síntese com significantes reduções nos custos e impacto ambiental.²⁷ A compreensão para a seletividade observada na atividade enzimática nas reações as quais catalisam, se deve ao controle do meio em que essas reações ocorrem. As enzimas limitam um número de sítios reativos de substratos pela eliminação ao acesso de reagentes, possibilitando a interação com apenas um grupo funcional, denominada quimioseletividade.²⁸

O potencial da Biocatálise ainda não é totalmente consolidado. Estas poucas conquistas não devem ser relevantes devido ao fato de que embora a Biocatálise tenha sido mais frequentemente usada em áreas tais como produtos químicos finos e produtos farmacêuticos, ainda representa um processo de segunda geração. De fato, essa área exige melhorias na disponibilidade de enzimas comerciais, bem como o rápido desenvolvimento de rotas sintéticas e processos de fabricação sustentáveis. É de importância crítica para expandir ainda os biocatalisadores disponíveis comercialmente de todas as seis diferentes classes de enzimas para atender o aumento do grau de sofisticação das moléculas a serem desenvolvidas.^{29,30}

2.2 Química Verde

Há quase 30 anos, após a criação da lei de Prevenção à Poluição nos Estados Unidos, a EPA (Agência de Proteção Ambiental, Environmental Protection Agency), através do Instituto de Prevenção à Poluição e Tóxicos (OPPT) lançou o programa de “Rotas Sintéticas Alternativas para Prevenção de Poluição” para financiar projetos que visassem a prevenção de poluição em suas sínteses fabricando produtos através de processos ambientalmente corretos, com uma linha de financiamento para projetos de pesquisa que incluíssem rotas sintéticas menos agressivas, caracterizando o nascimento da Química Verde.³¹

Em 1993, o programa expandiu-se incluindo outros tópicos sendo renomeado como Química Verde apresentando solventes “verdes” e produtos químicos que apresentam baixa toxicidade. Desde então, o programa estabeleceu colaboração com muitas instituições acadêmicas, industriais, órgãos governamentais e organizações não governamentais de forma a promover juntos o uso da Química para a prevenção da poluição.³²

A partir de então o termo Química Verde (Green Chemistry) é usado em todo o mundo para descrever o desenvolvimento ecologicamente correto e sustentável de produtos e processos químicos cuja definição é: “A invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos químicos e processos, para reduzir ou eliminar, o uso e a geração de substâncias perigosas à saúde humana e ao meio ambiente”.³³ Este conceito, não é novidade em aplicações industriais, principalmente em países com controle rigoroso na emissão de poluentes. Ao longo dos anos, os princípios da Química Verde têm sido inseridos no meio acadêmico, em atividades de ensino e pesquisa.³⁴

Deste modo, foram criados alguns princípios básicos englobando muitos dos conceitos levantados por movimentos anteriores, sendo chamado de 12 Princípios de Química Verde que são:^{33,34}

- Prevenção: a prevenção de resíduos é melhor que o tratamento posterior;
- Eficiência atômica: a síntese química deve maximizar a incorporação de todos os átomos dos reagentes no produto final desejado;
- Síntese com reagentes de menor toxicidade: a síntese química ideal, sempre que possível, deve utilizar e gerar substâncias que não sejam perigosas para a saúde humana e para o meio ambiente;
- Desenvolvimento de compostos seguros: os produtos químicos devem ser projetados para preservar a eficácia da sua função e serem atóxicos;
- Catálise: Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são superiores aos reagentes estequiométricos;

- Redução de solvente e auxiliares: a utilização de auxiliares (solventes, agentes de separação, etc) deve ser minimizada ou usadas substâncias inócuas no processo;
- Eficiência energética: a demanda de energia deve ser minimizada através de métodos sintéticos que utilizem temperatura e pressão ambiente, diminuindo o impacto econômico e ambiental;
- Uso de matéria-prima renovável: sempre que possível, técnica e economicamente, utilizar matérias-primas cada vez mais renováveis;
- Redução no uso de derivados: derivações devem ser minizadas, pois processos que utilizam reagentes bloqueados, de proteção ou desproteção, e modificadores temporários requerem reagentes adicionais e, conseqüentemente, podem produzir subprodutos indesejáveis;
- Desenvolvimento de compostos degradáveis, não permanecendo no meio ambiente;
- Análise em tempo real para a prevenção da poluição: processos químicos exigem um melhor controle por meio do desenvolvimento de metodologias analíticas, permitindo assim o monitoramento em tempo real, para controle da formação de compostos indesejáveis;
- Química segura para prevenção de acidentes: as substâncias e a forma com que uma substância é usada em um processo químico deve ser escolhido de forma que assegure um potencial mínimo para acidentes incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Martin Poliakof e Paul Anastas afirmam:

“Os doze princípios são tão óbvios que os químicos do futuro perguntarão porquê se demorou tanto tempo a integrá-los no íntimo da química”, “a revolução de uma geração continuará seguimento da próxima? Afinal, por que fabricar produtos químicos de maneira desperdiçada e dispendiosa, quando eles podem ser produzidos de maneira barata e limpa”.²⁶

Desta maneira, ao se procurar tecnologias que empregam os parâmetros estabelecidos pela Química Verde, deve-se estar atento a alguns pontos principais:

- O uso de rotas sintéticas alternativas para a química verde, tais como: catálise e biocatálise;
- Matérias-primas alternativas, que sejam mais inócuas e renováveis (biomassa, por exemplo);
- O uso de condições reacionais alternativas para a química verde, tais como: uso de solventes que tenham um impacto reduzido na saúde humana e no ambiente ou até mesmo a não utilização de solvente (condições livres de solvente);

- Aumento da seletividade e redução de resíduos e emissões de poluentes;
- O desenvolvimento de produtos químicos que sejam: menos tóxicos que as alternativas atuais; e mais seguros com relação a ocorrência de um possível acidente.³⁴

No contexto moderno, os termos “desenvolvimento sustentável” e “química verde” têm sido questionados. Essa discordância com relação aos termos começou em 1987 na Comissão das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (geralmente referidos como Comissão Brundtland) de modo que foi observado que a coesão econômica de desenvolvimento pode levar a uma deterioração, e não a melhoria na qualidade de vida das pessoas, o que conduziu a definição atualmente aceita como “Desenvolvimento Sustentável”.³¹

Tal definição diz que este “desenvolvimento deve satisfazer as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das futuras gerações satisfazendo suas próprias necessidades”.²⁶ Todavia, ressalta que é naturalmente impossível criar produtos químicos sintéticos sem insumos químicos. Porém, a Química Verde indica que há muitas rotas possíveis a partir de materiais alternativos e abundantes para a síntese de produtos de interesse para a sociedade. No entanto, até o presente momento poucos foram os esforços feitos para limitar o uso de solventes orgânicos e substituí-los por novos meios mais “verdes” ou até mesmo eliminá-los completamente (condições livres de solvente). Desse modo, a busca por procedimentos mais limpos acompanha o surgimento de novos desafios no âmbito da química orgânica sintética.³⁴ O progresso na Química Verde tem sido alcançado em diversas linhas de pesquisa, como na catálise, no uso de solventes menos nocivos ao ambiente e no desenvolvimento de processos que utilizam matérias-primas renováveis. Entretanto, esses desafios abrem portas para oportunidades de novas descobertas em química.³⁵

Além disso, com o conceito de Química Verde, surge a oportunidade de recuperar a imagem da indústria química, a qual almeja rotas menos poluentes. Novos acordos internacionais como o Protocolo de Montreal sugerem minimizar o uso de solventes, e nesse ínterim as indústrias estão interessadas em alternativas economicamente viáveis.³⁶

2.3 Enzimas

Constituídas de *L*-aminoácidos ligados covalentemente em uma sequência definida, as enzimas são macromoléculas que apresentam uma massa molecular variando entre cerca de 5 a até mais de 1.000 kDa.^{37,38} As enzimas são catalisadores naturais, que apresentam propriedades únicas que as tornam altamente almejada para aplicação em processos industriais.

Isto deve-se à sua biodegradabilidade, alta especificidade e alta eficiência catalítica.³⁹⁻⁴¹ Na **Tabela 1** estão descritas as classificações das enzimas e suas funções catalíticas.

Tabela 1. Classificação das enzimas e suas funções catalíticas segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB).⁴²

| Classes | Funções catalíticas |
|-------------------------|---|
| 1. Oxirredutases | Catalisam reações de oxidação-redução. |
| 2. Transferases | Enzimas que mediam a transferência de grupos funcionais de uma molécula a outra. |
| 3. Hidrolases | Catalisam reações de hidrólise. |
| 4. Lipases | Catalisam reações de quebra de ligações, formando dupla ligação ou ainda, catalisam a adição de grupos a duplas ligações. |
| 5. Isomerases | Catalisam reações de mudança intramolecular em que um substrato é transformado em um produto isômero |
| 6. Ligases | Catalisam a ligação covalente de moléculas com ligação de alta energia. |

Fonte: LEHNINGER, NELSON, COX, 2000.

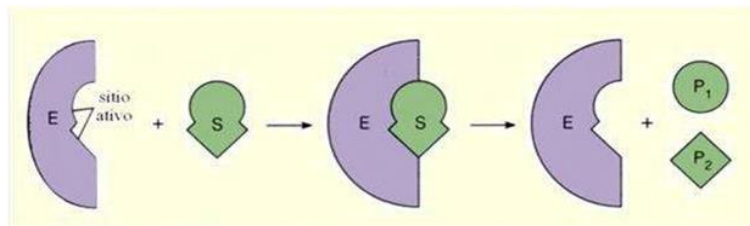
Algumas enzimas não requerem nenhum tipo de grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem componentes químicos adicionais chamados de cofatores.⁴³ Os cofatores são substâncias não proteicas de pequena massa molecular, que fornecem os “reagentes químicos necessários” para que as reações ocorram nos sítios catalíticos.⁴⁴ Estes podem ser íons inorgânicos (K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}), permanentemente ligados às enzimas denominados de grupos prostéticos, ou ainda, moléculas orgânicas complexas denominadas coenzimas, como os derivados de vitaminas (flavina, tiamina, niacina), ácido ascórbico e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) ou fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH).⁴²

Apesar da ação das enzimas ter sido reconhecida e os biocatalisadores terem sido praticamente utilizados pelo homem há milênios, o interesse científico que conduziu à sua identificação é relativamente recente, tendo se iniciado em meados do século passado. No mesmo período, aprofundaram-se os conhecimentos sobre o metabolismo, na química orgânica e na química das proteínas, fatores que contribuíram para o desenvolvimento da enzimologia e da tecnologia enzimática.⁴⁵

A ocorrência de reações enzimáticas inicia-se pela interação do substrato ligando-se ao sítio ativo da enzima, promovendo mudanças na constituição eletrônica proveniente destas

interações químicas. Essas mudanças possibilitam que as reações químicas ocorram e levem a formação de produtos de interesse. Após a obtenção dos produtos, estes, por não mais terem ligações específicas com o sítio catalítico das enzimas, são dissociados e liberados no meio reacional, e o ciclo catalítico é regenerado para promover novas reações.⁴² Na **Figura 1** é mostrada esquematicamente a interação do substrato com o sítio catalítico da enzima para uma reação catalisada.

Figura 1. Representação esquemática de uma interação enzima-substrato e sua catálise (E = enzima, S = substrato, P = produto).



Fonte: LEHNINGER, NELSON, COX, 2000.

Desde o final do século XVII as enzimas são conhecidas, no qual vários estudos mostraram a explicação da relação das secreções do estômago com a digestão de carne em seres humanos. O termo “enzima” vem do grego *en*, (em) + *zyme*, (levedura), nome este que procura enfatizar que tal substância se encontra na levedura (mas não é a levedura) e foi relatada pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne.⁴⁶

As configurações da estrutura proteica e do sítio ativo conferem às enzimas uma alta especificidade. Neste sentido, o substrato orgânico deve também apresentar conformação adequada para acomodar-se no sítio catalítico. Alguns modelos empíricos foram propostos relacionando esta interação entre o sítio ativo das enzimas e a molécula do substrato.⁴⁷

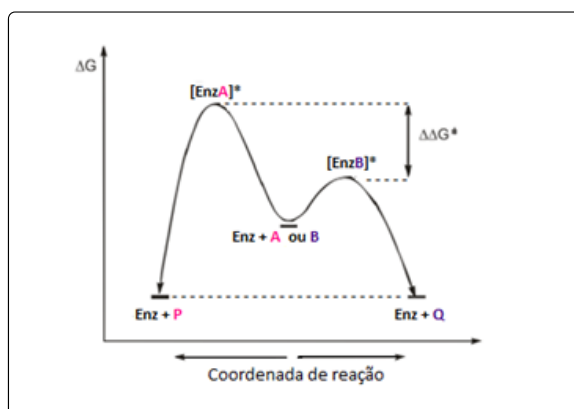
O modelo chave-fechadura proposto por Emil Fisher (1894) pressupõem que o sítio ativo teria uma forma geométrica única e complementar a do substrato.⁴⁸ Um segundo modelo de sítio catalítico, denominado de *encaixe induzido* foi proposto por Koshland Jr. em 1958.⁴⁹ Neste modelo a enzima apresenta uma estrutura flexível e durante a formação do complexo enzima-substrato (ES), a enzima pode mudar ligeiramente a sua conformação sob a influência da estrutura do substrato. Neste modelo, uma mudança na conformação enzimática é induzida, a qual permite orientar os grupos reativos do substrato ao sítio catalítico e favorecer o produto almejado. Este modelo de encaixe induzido tem sido utilizado para compreender a especificidade da catálise enzimática.⁵⁰ Assim, surge a promiscuidade catalítica que consiste na capacidade das enzimas em alterar o seu arranjo conformacional mediante as condições

reacionais, tais como por exemplo, substrato, tipo de reação a ser realizada, solvente, pH e temperatura.⁵¹

A natureza quiral das enzimas resulta na formação de produtos de maneira altamente estereo- e regioseletiva. A capacidade de atuar sob temperaturas brandas, condições neutras e aquosas, além do elevado número de ciclos catalíticos, faz com que o uso de enzimas ganhe destaque no âmbito da síntese orgânica. Muitas enzimas podem promover a biotransformação de vários substratos em produtos, dificilmente obtidos por rotas químicas, ou ainda atuar em reações nas quais não existem alternativas químicas viáveis.⁵²

As enzimas podem catalisar reações através da diminuição da energia de ativação, como em qualquer outra reação catalisada, porém, de forma estereosseletiva. Em uma resolução cinética enzimática ideal, os enantiômeros A e B de um racemato interagem de maneira distinta com a estrutura quiral da enzima (Enz). Dessa forma, os complexos diastereoisoméricos enzima-substrato, formados a partir da interação de cada enantiômero com a enzima, possuem diferentes valores de energia livre de Gibbs (ΔG) para seus respectivos estados de transição $[\text{EnzA}]^\ddagger$ e $[\text{EnzB}]^\ddagger$ (**Figura 2**). Como consequência disso, observa-se uma diferença na energia de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$) entre as reações de A e B com a enzima.⁵³

Figura 2. Diagrama de energia para uma reação enantiosseletiva catalisada por enzimas.⁵³



Sendo assim, o enantiômero B (Figura 3), por exemplo, adequa-se melhor ao sítio ativo da enzima, o complexo diastereoisomérico EnzB^\ddagger levará ao estado de transição com menor energia, e B será transformado em Q mais rapidamente que o enantiômero A, que levaria ao produto P.⁵⁴ Se o processo biocatalítico for eficiente, espera-se que o valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$ seja suficientemente alto, para que somente um enantiômero seja transformado no produto desejado, assim a conversão ideal será de 50% e compostos envolvidos serão obtidos com elevada pureza óptica (> 99%).⁵⁵

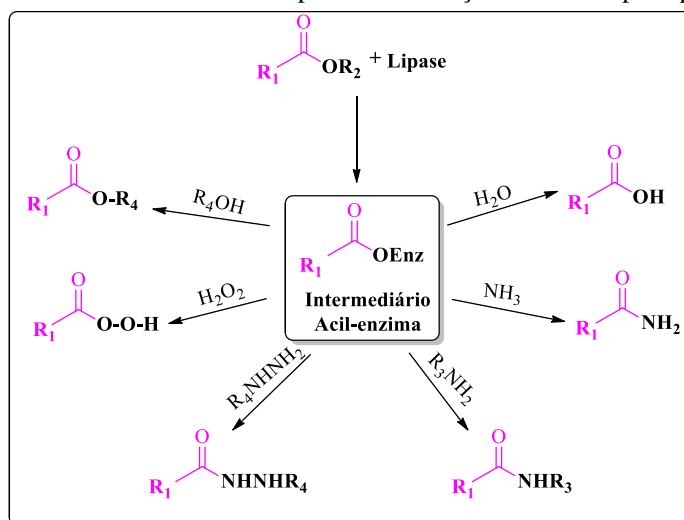
2.3.1 Lipases

As lipases são enzimas nomeadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como triacilglicerol hidrolases e desempenham um papel fundamental na digestão de gorduras pela clivagem de triglicerídeos de cadeia longa.⁵⁶ Devido à polaridade oposta entre a enzima (hidrofílica) e seus substratos (lipofílico), as reações que envolvem a lipase ocorrem na interface entre as fases aquosas e oleosas.⁵⁷ Por este motivo, as interfaces são os pontos-chave para a Biocatálise e um local apropriado para a lipólise. O conhecimento sobre os efeitos da composição interfacial em catálise na qual utilizam a lipase ainda é limitado e o que se observa na literatura são apenas termos como “a qualidade interfacial”.⁵⁸ Vale ressaltar que estudos com base em uma abordagem biofísica permitiram, pela primeira vez, mostrar os efeitos do microambiente em catálise interfacial das lipases. Estes estudos demonstraram que a atividade da lipase em relação a sua composição interfacial está mais atribuída a inacessibilidade do substrato do que a desnaturação da enzima ou até mesmo sua inativação, como o que se era proposto.⁵⁹

As lipases são encontradas em micro-organismos, em animais e em vegetais foram descritas pela primeira vez em 1973,⁶⁰ demonstrando que tem alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e mais simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva.⁶¹

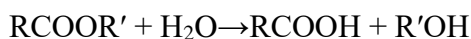
As lipases são as enzimas mais utilizadas em química orgânica devido à sua especificidade por um grande número de substratos, além de apresentar uma elevada enantioselectividade. Além disso, as mesmas são frequentemente utilizadas como biocatalisadores em síntese orgânica, devido à sua disponibilidade, baixo custo de produção, não necessidade de cofatores, ampla especificidade de substrato, alta enantioselectividade, bem como alta estabilidade em meios não aquosos, como fluídos super críticos e solventes orgânicos.⁶²

Quando formado o complexo diastereoisomérico entre a enzima e o substrato, logo o mesmo pode sofrer uma reação como, por exemplo, o ataque de um nucleófilo presente no meio reacional. No caso das lipases, algumas das espécies nucleofílicas podem ser a água, a amônia, aminas, hidrazinas, o peróxido de hidrogênio ou um álcool (**Figura 3**).⁶³

Figura 3. Diferentes nucleófilos aplicáveis às reações mediadas por lipases.

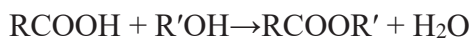
As duas principais categorias em que as reações catalisadas pela lipase podem ser classificadas são:

1) Hidrólise:

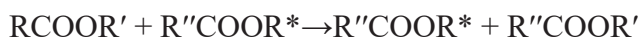


2) Síntese: reações desta categoria podem ser classificadas em:

a) *Esterificação*



b) *Interesterificação*



Contudo, as lipases realizam inúmeras outras reações tais como: alcoólises, aminólises, peroxidações e epoxidações e interesterificações. Isto se deve a uma característica denominada na literatura de promiscuidade da enzima, que as tornam aplicáveis em diversas áreas como a de produtos farmacêuticos, produção de biodiesel e modificação de alimentos. Entretanto, para o uso de qualquer tipo de enzima na indústria é preciso considerar seu mecanismo de ação individual.⁶³

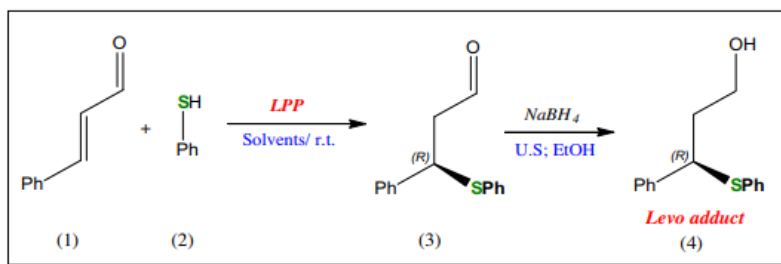
O mecanismo de ação das lipases envolve inúmeros fatores relacionados com a ativação da atividade catalítica. Um dos fatores que pode afetar as propriedades catalíticas dessas enzimas é a estabilidade em solventes orgânicos. As conformações abertas e cataliticamente competentes de várias lipases têm como característica comum o fato de que a área em torno do sítio catalítico possui caráter hidrofóbico.^{55,63}

No entanto, devido à extrema flexibilidade dos centros ativos das lipases, as suas propriedades catalíticas podem ser facilmente alteradas sem inativar a enzima. Assim, as propriedades das lipases podem ser moldadas por pequenas mudanças nas condições de reação, principalmente dos solventes, o que pode originar novos produtos opticamente ativos e ampliar consideravelmente as possibilidades de aplicações comerciais destas enzimas.⁶⁴

Assim, as lipases são excelentes alternativas para as sínteses químicas clássicas, com aplicação na indústria de alimentos, detergentes, óleoquímica, farmacêutica, de química fina, de cosméticos e fragrâncias, de polpas e papel, de couro, de biosensores e no tratamento de efluentes ricos em óleos e graxas.^{62,65,66} Atualmente, as pesquisas buscam sua caracterização estrutural, elucidação do mecanismo de ação, exploração e aprimoramento das propriedades enantiosseletivas das lipases, que podem ser facilmente moduladas pelas condições de reação e pequenas variações na estrutura das enzimas que podem causar consideráveis mudanças em suas propriedades.⁶³

Um exemplo de aplicação das lipases em sínteses químicas é o trabalho reportado por Rizzo e colaboradores (2014)¹⁵, no qual os autores realizaram uma reação de tio-Michael biocatalisada. Como ponto de partida, estudaram a reação envolvendo o cinamaldeído (1) com tiofenol (2) a fim de descrever as melhores condições apenas para a tio-adição no carbono- β sem o ataque à carbonila (**Esquema 1**).

Esquema 1. Reação de tio-Michael usando LPP como biocatalisador.¹⁵



2.3.2 Quimosina

A Quimosina, também conhecida como renina, é uma aspartil protease que catalisa a quebra das ligações peptídicas em outras proteínas sendo encontrada no abomaso (quarto estômago dos ruminantes) de bezerros lactantes e de outros ruminantes jovens.⁶⁷ Logo, foi a primeira enzima recombinante derivada de fonte geneticamente modificada a receber aprovação para uso alimentar na Suíça, em 1988, e nos Estados Unidos, em 1990.⁶⁸ Constitui uma classe de enzimas com inúmeras aplicações tanto no campo fisiológico quanto no setor

comercial. No entanto, poucos são os trabalhos de síntese orgânica que reportam o uso dessas enzimas.⁶⁶

Estruturalmente, é uma proteína com cadeia polipeptídica única de 323 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 35600 Da. diferente das outras proteínas gástricas aspárticas que processam todas as proteínas no lúmen gástrico, a quimosina é específica para uma das proteínas do leite: a caseína k, apresentando baixa atividade proteolítica sobre as outras proteínas, e por esse motivo, a quimosina tornou-se atraente para a indústria de queijo.⁶⁹

Existem duas formas alélicas de quimosina naturalmente produzidas de bezerros: quimosinas A e B que diferem em apenas um resíduo de aminoácido na posição 244: um aspartato na quimosina A e uma glicina na quimosina B. A presença desses aminoácidos garante uma maior afinidade da quimosina A pela caseína k devido a uma estabilização adicional eletrostática do complexo caseína-k-quimosina, e uma maior estabilidade da quimosina B em pH abaixo de 5.⁶⁶

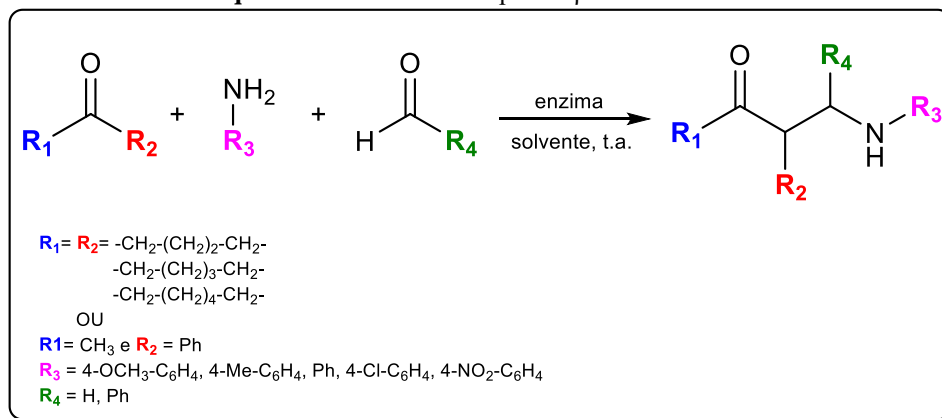
Devido a problemas de escassez e de flutuação no custo de coalho de bezerro, bem como sua qualidade insatisfatória, os cientistas começaram a investigar a possibilidade de atribuir a microrganismos a produção de quimosina idêntica à produzida pelas células do estômago do bezerro. Para isso foi introduzido o gene do bezerro responsável pela produção de quimosina num microrganismo hospedeiro, a *Escherichia coli*, que é um microrganismo conhecido, facilmente cultivável.⁷⁰

Atualmente apenas três empresas internacionais (Pfizer, Chr-Hansen e Girst Brocades) produzem e comercializam quimosinas recombinantes. As quimosinas recombinantes passam por rigorosos testes bioquímicos, toxicológicos e microbiológicos para garantir a sua pureza. A FDA (Food and Drug Administration) concluiu que as enzimas recombinantes são idênticas e mais puras que os extratos enzimáticos extraídos do bezerro, o que conferiu o status GRAS (Generally Regarded as Safe) para estas preparações.⁷⁰

A quimosina recombinante representa cerca de 60% das vendas de todas as enzimas industriais do mundo devido às suas aplicações em diversos setores fabril como em detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos, produtos químicos, couro, papel e celulose e indústrias de seda, já que estas apresentam custos reduzidos e podem ser produzidas em quantidades satisfatórias em fermentações industriais.⁶⁶

Lima (2012)⁷¹ realizaram a primeira reação de síntese de compostos β -aminocetônicos utilizando-se quimosina como biocatalisador na reação de Mannich e obtendo bons resultados (**Esquema 2**).

Esquema 2. Síntese de compostos β-aminocetônicos.



2.3.3 Albumina

A Albumina foi estudada por muitos anos e é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, representando cerca de 60% da proteína total e fornecendo cerca de 80% da pressão osmótica do sangue. As albuminas têm sido utilizadas como proteína modelo para muitos estudos biofísicos, bioquímicos e físico-químicos. Estas proteínas têm propriedades de ligação hidrofóbicas, tais como ácidos graxos, lisolecitina, bilirrubina, varfarina, triptofano, esteróides, anestésicos e vários corantes. Sua estrutura primária é constituída por uma única cadeia de cerca de 580 resíduos de aminoácidos. Sua estrutura secundária é formada por 67% de α hélice de seis voltas e 17 pontes dissulfeto.⁷² A albumina desempenha um papel de suma importância sendo responsável pelo transporte de vários compostos de importância biológica, como ácidos graxos, hormônios e vitaminas.⁷³

Essas proteínas são também responsáveis por manter a pressão osmótica necessária para a distribuição adequada dos fluidos corporais entre os compartimentos intravasculares e tecidos corporais. Essas características aumentam o interesse pelos estudos dessas moléculas, pois uma pequena alteração estrutural pode afetar suas importantes funções biológicas.

2.4 Imobilização de enzimas

As enzimas estão submetidas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, que eventualmente podem ocorrer. Com a finalidade de que a catálise seja eficaz em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas do meio no qual é realizada a reação e que poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização.⁷⁴

Enzimas são frequentemente utilizadas, mas sua curta vida catalítica dificulta sua utilização e aumenta o custo das suas aplicações. Sendo assim, a utilização de enzimas imobilizadas, uma tecnologia bem estabelecida e consolidada, que melhora a estabilidade e, portanto, a viabilidade econômica do processo, principalmente em escala industrial.^{75,76} Neste sentido, as enzimas imobilizadas tornam-se uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como alta atividade e seletividade.⁷⁶

Entretanto, uma das definições mais abrangentes de enzimas imobilizadas é a que considera imobilizadas “enzimas que estão fisicamente confinadas, ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente”. Como descrito por Kennedy e White, o primeiro relato sobre a imobilização de enzimas foi de Nelson e Griffin que, em 1916, verificaram que a enzima invertase adsorvida em carvão ativado mantinha sua atividade e não era retirada com as lavagens. Desde esta época, vários métodos de imobilização foram desenvolvidos. É preciso ter em mente o sistema na qual a enzima imobilizada será utilizada no momento da escolha do método de imobilização, uma vez que cada método traz intrinsecamente limitações que precisam ser consideradas.⁷⁵

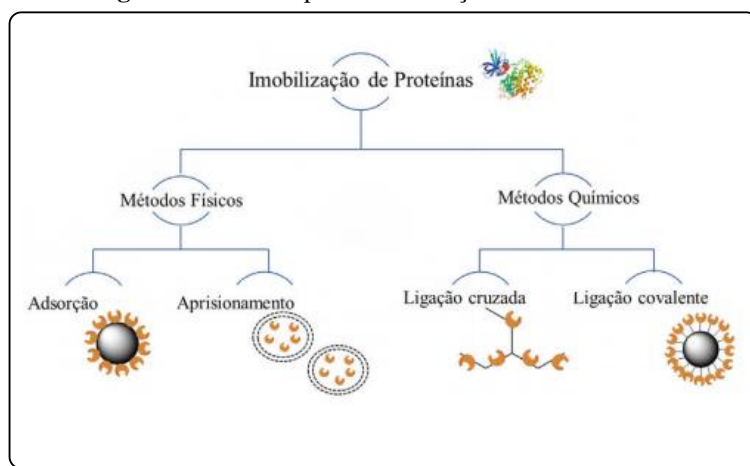
A imobilização de enzimas à suportes, apresentam diversas vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, entre as quais destacamos: a utilização de pequenos volumes de amostra; aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH, sem perda considerável da atividade catalítica; reutilização; pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações; fácil separação da enzima dos produtos da reação. Essas vantagens são úteis nos estudos enzimáticos, em que os produtos da reação enzimática e os inibidores são detectados diretamente por UV-vis, fluorescência ou espectrometria de massas.⁷⁷

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outras. Podendo ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura em gel.^{78,79}

2.5 Métodos de imobilização

Vários métodos de imobilização são empregados os quais se baseiam nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de van de Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada.⁸⁰ Esses métodos estão sumarizados na **Figura 4**.

Figura 4. Métodos para imobilização de enzimas.⁸⁰



A escolha criteriosa de uma estratégia de imobilização de enzimas é baseada na eficácia da utilização da enzima, os custos do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas do biocatalisador imobilizado.⁸¹ Por esse motivo a avaliação da caracterização físico-química aliada à caracterização bioquímica destes sistemas imobilizados se intensificou na última década. Os biocatalisadores imobilizados em suportes inorgânicos já foram estudados por diversos grupos,⁸² mas poucos relatam a imobilização em suportes orgânicos.

Os suportes utilizados nessa técnica podem ser de origem orgânica (lignocelulósicos, Quitosana, polissacarídeo,) ou de origem inorgânica (celite, bentonita, alumina e sílica) ou suportes híbridos.⁸³

2.5.1 Adsorção

A imobilização de enzimas por meio do método de adsorção física foi uma das primeiras técnicas reportada.⁸⁴ A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Neste caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas

com o suporte como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas), ligações de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima, devido às variações de temperatura, pH e força iônica.⁸⁵

O método de adsorção física para a imobilização de enzimas é baseado em adsorção física da proteína da enzima na superfície de suportes insolúveis. A enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso. Tal método tem como desvantagem a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção por meio de variações de temperatura, pH e força iônica.⁸⁰ Como alternativa para contornar essas desvantagens, diversos métodos foram desenvolvidos nos últimos anos, como por exemplo a modificação química do suporte e a utilização de agentes reticulantes.⁸⁶

Macario e colaboradores, reportaram o papel das interações eletrostáticas e covalentes ácido-base, entre enzima e suporte, utilizando a enzima Rhizomucor mieheilipase (RML) imobilizada em materiais zeólitos. As maiores atividades de lipase foram obtidas quando esta enzima, imobilizada por adsorção, interage por meio de forças de ligação ácido-base com a superfície de suporte, resultando na ativação do centro catalítico da enzima.⁸⁷

Sheldon e Pelt reportaram a imobilização de enzima em um suporte pré-fabricado, uma resina acrílica macroporosa, por simples adsorção. O processo possibilitou a estabilização da enzima, evitando a lixiviação. Os autores utilizaram matérias-primas baratas prontamente disponíveis, além disso, a alta retenção de atividade (92%) indicou que nenhuma limitação de difusão significativa foi causada pelo revestimento de silicone.⁸⁸

2.5.2 Encapsulação

O método consiste na proteção às biomoléculas através da sua imobilização no interior de uma rede polimérica ou microcápsulas de polímeros que representa um microambiente separado do ambiente externo e permite o substrato e os produtos passarem através dos mesmos.⁸⁹ O método de encapsulação chama atenção para a formação de diversas estruturas como estudos realizados recentemente envolvendo materiais inorgânicos e orgânicos.⁹⁰

Dentre as principais vantagens da encapsulação estão na possibilidade de modificação da matriz quimicamente; permeabilidade das matrizes, que permite adaptação de biomoléculas de tamanhos variáveis, transporte de composto com baixo peso molecular sem desprendimento das biomoléculas imobilizadas; além de resistências a agentes térmicos, químicos e degradação

biológica.⁸⁵ No entanto, o método de encapsulação em sistemas preparados para aplicações catalíticas, também tem como considerações importantes o efeito que a estrutura escolhida pode ter em fatores como a difusão e/ou a seletividade do substrato.⁹⁰

Feng e colaboradores desenvolveram uma série de estruturas metal-orgânicas estáveis projetadas racionalmente como armadilhas de molécula única (SMTs), utilizando o encapsulamento de enzimas. As enzimas imobilizadas que mais provavelmente sofreram encapsulamento de enzima única (SEE) mostraram velocidade menor do que as enzimas livres, enquanto mantiveram eficiência catalítica comparável. Em condições adversas, a enzima em SEE exibiu melhor desempenho do que a enzima livre, mostrando a eficácia de SEE na prevenção da agregação ou desnaturação da enzima.⁹¹

Caruso (2005) reportou a imobilização de várias enzimas em esferas de sílica mesoporosa, seguida por encapsulamento via montagem de camadas finas de nanocompósitos. Uma gama de enzimas com diferentes tamanhos moleculares (por exemplo, catalase, peroxidase, citocromo C e lisozima) foi examinada em partículas de sílica. Esferas de sílica mesoporosa mostraram taxas de imobilização mais rápidas e capacidade de imobilização de enzima significativamente melhorada do que partículas semelhantes com apenas mesoporos menores.⁹²

2.5.3 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é tão comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte, e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo.⁷⁹

Este método emprega os mais variados tipos de ligação, sendo possível imobilizar uma enzima através de qualquer um de seus grupos superficiais reativos. Assim sendo, há uma gama imensa de reações que podem ser utilizadas para imobilização via ligação covalente.⁹³

Assim, dentre as vantagens da imobilização covalente estão evitar o fenômeno de dessorção, a diminuição da velocidade de desativação espontânea, além de aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica do biorreator. As ligações covalentes promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida a altas temperaturas. No

entanto, apresenta como desvantagem a facilidade em alterar a estrutura terciária nativa da enzima, com subsequente redução da atividade catalítica.⁹⁴

Dai e colaboradores em 2010 realizaram a adsorção de Lipase *Cândida rugosa* em SBA-15 estabilizada por ligação covalente com quitosana. Os autores utilizaram glutaraldeído para realizar a ligação covalente entre as enzimas e os grupos NH₂ da quitosana. As enzimas imobilizadas apresentaram atividade 4.5 vezes maior quando comparada à enzima livre e 56% mais atividade quando comparado com as enzimas imobilizadas apenas com SBA-15. A atividade das enzimas imobilizadas foi mantida em 80% mesmo após 6 ciclos de reuso.⁹⁵

Jasra e Kannan em 2009 reportaram a imobilização por ligação covalente de endopeptidase alcalina em suporte polimérico visando avaliar a estabilidade, atividade e reutilização em comparação às enzimas livres. Os autores realizaram a imobilização covalente através da formação de amida em SBA-15 modificada e espuma mesocelular. A enzima imobilizada teve maior atividade específica, maior tolerância de temperatura e pH, e maior reusabilidade.⁹⁶

2.6 Química em Fluxo

A química orgânica é uma área excepcionalmente ampla da química moderna que abrange investigações fundamentais de mecanismos de reações, identificação de compostos naturais e otimização de sínteses de laboratório, bem como sua escala até um nível tecnológico. A utilização de condições de fluxo para realizar sínteses é uma parte muito importante do desenvolvimento da química de fluxo.⁹⁷

Mesmo com a evolução da síntese orgânica nos últimos 30 anos em relação ao desenvolvimento de novas metodologias ou no aperfeiçoamento das técnicas de análise, o uso de balões reacionais e condições de refluxo ainda é uma realidade na maioria dos laboratórios de pesquisa. No entanto, nas últimas décadas novas tecnologias mais sustentáveis têm sido desenvolvidas para promover reações orgânicas de forma rápida e reprodutível, como a irradiação por micro-ondas e, mais recentemente, os reatores em fluxo contínuo. Neste sentido, a síntese em fluxo contínuo tem sido implementada em diversos laboratórios e é uma alternativa crescente no desenvolvimento de novos processos e no escalonamento de reações.⁹⁸

Nas sínteses em fluxo contínuo, as reações ocorrem linearmente em sistemas onde os reagentes solubilizados ou dispersos são bombeados por tubos inertes conectados entre si. A síntese pode ser planejada de modo a não necessitar purificação dos intermediários, e mesmo que seja necessária uma purificação, a mesma pode ser realizada dentro do sistema de fluxo

contínuo, pela utilização de técnicas de purificação em linha.⁹⁹ Apresentando diversas vantagens, como a diminuição da utilização de solventes, diminuição ou eliminação de processos de extração e purificação, utilização mais segura de altas temperaturas e pressões ou reagentes perigosos, e aumento da eficiência em processos interfaciais, como transferência de calor, a síntese em fluxo contínuo se mostra uma atividade próspera. Devido a todas as vantagens apresentadas, as reações em fluxo contínuo já são realidade nas indústrias farmacêuticas, e vem ganhando cada vez mais espaço na indústria química em geral.⁷

Com um avanço significativo na tecnologia de laboratório, a química tem a oportunidade de se tornar mais eficiente, segura e automatizada.¹⁰⁰

A tendência de questionar a adequação das vidrarias clássicas de laboratório e de se utilizar equipamentos de síntese mais “adequados para o propósito” não só permite que os pesquisadores conduzam suas pesquisas de uma maneira mais moderna, mas também ajusta sua mentalidade para a amplitude prática total de planejamento de síntese. Desta forma, os pesquisadores estão mais cientes de toda a sequência de processamento, considerando a temperatura, processamento, extração e purificação como parte do projeto holístico da rota preparativa.¹⁰¹

A química de fluxo surge como uma tecnologia abrangente, que concilia pequenos reatores nos quais fluxos de substratos e reagentes podem ser unidos para reagir em um ambiente altamente controlado e reprodutível. Este trabalho de fluxo, permite a automação fácil e a operação contínua de tais processos.¹⁰² As principais vantagens da utilização do fluxo contínuo para melhorar a segurança operacional são principalmente os estoques reduzidos de produtos químicos reativos, as pequenas unidades de reator contidas e a capacidade de instalar monitoramento em tempo real do sistema, levando à rápida identificação de problemas e à criação de protocolos de desligamento seguro automatizado. Além disso, o uso de purificação direta, gera uma sequência de reação mais simplificada e enriquecida.¹⁰¹

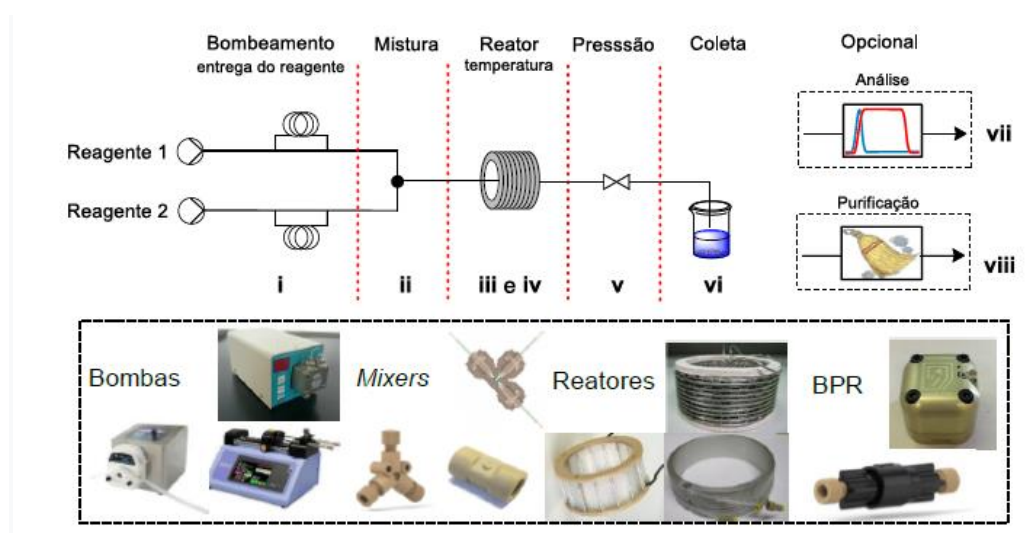
Embora vários sistemas disponíveis comercialmente possam mediar transformações de fluxo contínuo, muitos laboratórios constroem seus próprios equipamentos a partir de peças acessíveis e prontamente disponíveis.¹⁰³

Assim, a comunidade envolvida com a química em fluxo contínuo vem demonstrando que é possível substituir os frascos tradicionais por micro reatores contínuos.¹⁰⁴ De fato, muitos artigos de revisão vêm demonstrando as grandes contribuições e o amadurecimento desta tecnologia no campo da síntese orgânica.¹⁰⁵ Um dos desafios dessa área, e constantemente discutido, é a diferença de interesses entre a indústria e a academia. Os interesses industriais são amplamente fundados no custo. Consequentemente, o gerenciamento de energia é um

elemento chave na indústria química. Assim, um processo em fluxo contínuo que traz reduções de gasto energético pode ser particularmente interessante do ponto de vista industrial, mas é irrelevante para um acadêmico, cujo interesse provavelmente pertence ao rendimento, conversão e seletividade do processo reacional.¹⁰⁶

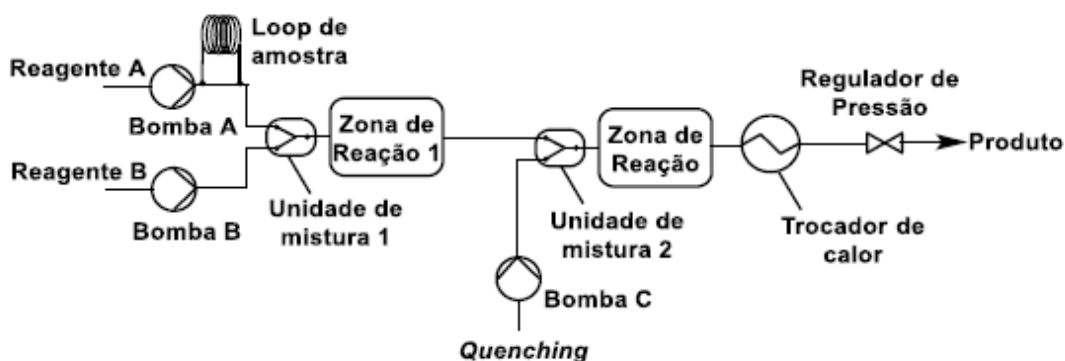
A química em fluxo é uma técnica modular que fornece uma caixa de ferramentas para os químicos sintéticos. Uma configuração de fluxo contínuo para aplicações sintéticas pode ser dividida em oito zonas básicas: **i)** bombeamento; **ii)** mistura; **iii)** reator; **iv)** temperatura; **v)** pressão; **vi)** coleta; **vii)** análise e; **viii)** purificação (**Figura 5**).¹⁰²

Figura 5. Zonas de uma configuração padrão de fluxo e as respectivas unidades que compõem um sistema contínuo.¹⁰²



Entretanto, a aplicação dos reatores de fluxo em síntese orgânica não é trivial, uma vez que para cada reação estudada um sistema deve ser planejado e sua montagem otimizada. De modo geral, tais sistemas são compostos por módulos e acessórios que podem ser divididos em cinco zonas principais: entrada de solvente e reagente, misturadores, reatores, e regulação de pressão. Além disso, zonas de purificação e análise também podem ser integradas aos sistemas (**Figura 6**).¹⁰⁷

Figura 6. Diagrama simplificado dos principais componentes de um sistema em fluxo contínuo utilizado em síntese orgânica.¹⁰⁷



Uma das motivações para a síntese de compostos orgânicos em fluxo está relacionada à necessidade de escalonamento das reações. O aumento da escala de reações em batelada pode ser acompanhado por perdas na eficiência, rendimento e seletividade das mesmas, devido principalmente à diminuição da eficiência da transferência de energia. Neste contexto, os processos contínuos têm como vantagem a maior facilidade do escalonamento reacional, através do uso de vários sistemas em paralelo, muitas vezes sem que haja a necessidade de reotimização das condições reacionais e/ou perda significativa da eficiência do processo.¹⁰⁸

Compostos e intermediários instáveis representam um grande desafio em metodologias sintéticas, e métodos de síntese em fluxo contínuo têm contribuído muito nessa área, abrindo caminhos e perspectivas para a exploração destes compostos.⁸

Reatores em fluxo desempenham um papel importante, melhorando muito os processos de transferência de calor e a homogeneidade geral do sistema. Regularmente, reações rápidas e exotérmicas, que funcionam bem em escala de bancada, apresentam problemas de reprodutibilidade e rendimento quando sua escala é aumentada. Para resolver o problema, usualmente se utilizam diluições e adições lentas em baixa temperatura. Utilizando micro reatores tubulares em fluxo contínuo pode-se aumentar muito a superfície de contato do meio reacional, melhorando a dissipação de calor e a homogeneidade do sistema.¹⁰⁰

Nesse contexto, a química em fluxo contínuo direcionada para síntese em multietapas¹⁰⁰ ou processos sintéticos *end-to-end* para produção de compostos¹⁰⁹ é atualmente uma área atraente e que traz ótimas oportunidades para redução de custos de um modo geral. No entanto, tempo e recursos precisam ser alocados pelas indústrias químicas a fim de substituir os processos já existentes em batelada para o contínuo. Citando alguns exemplos, a multinacional britânica GlaxoSmithKline (GSK), está atualmente colhendo os frutos de um

investimento de U\$ 50 milhões para o desenvolvimento de uma tecnologia contínua que visa a produção de um importante IFA (Insumo farmacêutico ativo) usado em medicamentos respiratórios. Neste processo, os estágios finais de cristalização, filtração e secagem ainda são executados em batelada.¹¹⁰

Outra multinacional que tem investido nesse campo é a empresa Eli Lilly. No ano de 2017, químicos da empresa demonstraram a síntese em fluxo contínuo de um quimioterápico candidato a fármaco, o monolactato de prexasertib mono-hidratado, usado em pequenos reatores contínuos. De modo geral, o processo contínuo proporcionou melhor desempenho e segurança.¹¹¹ De modo geral, o processo contínuo proporcionou melhor desempenho e segurança em relação ao processo em batelada e, igualmente, atendeu as normas de boas práticas laboratoriais. Dando continuidade no amadurecimento desta tecnologia nas indústrias, em 2017, a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, sigla em inglês) colocou seu peso na transição e aprovou a primeira troca de um processo para fluxo contínuo.¹¹⁰ O medicamento da vez foi o Prezista, utilizado para tratar infecções pelo vírus do HIV. Reguladores europeus e japoneses também estão avaliando a mudança de protocolos para fluxo contínuo.¹¹⁰

Considerando os 12 princípios da Química Verde, criados por Anastas e Warner em 1998,¹¹² várias características dos processos químicos foram revisadas no intuito de torná-los mais sustentáveis. Dentre elas, destacam-se a necessidade do planejamento de reações com maior economia atômica e mais seguras, o uso de reagentes de fonte renovável, o aumento da eficiência energética e a diminuição de resíduos. Neste contexto, a síntese em fluxo contínuo apresenta-se como uma ferramenta importante na busca pelo aumento da sustentabilidade desses processos, tanto em escala acadêmica como industrial.¹¹³

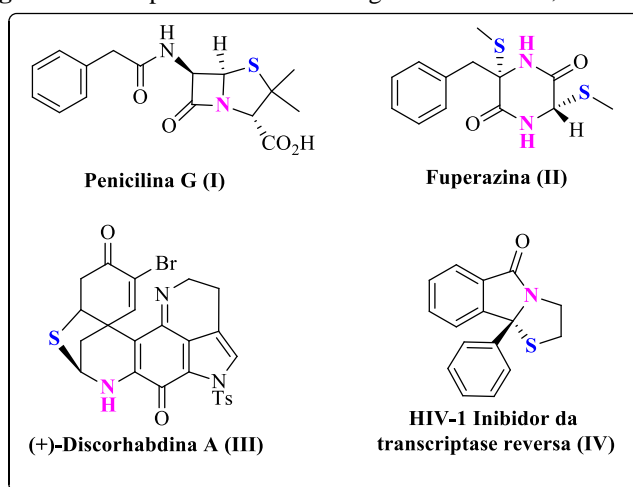
2.7 Síntese de compostos *N,S*-acetais

A formação da ligação C-S é considerada de suma importância e tem atraído diversos pesquisadores devido aos compostos organossulfurados constituírem diversas moléculas bioativas, tais como a coenzima M, e por possuírem valiosas propriedades biológicas. Dentre diversos procedimentos desenvolvidos para formação da ligação C-S, a adição nucleofílica de tiois a compostos insaturados como iminas têm sido considerada uma eficiente estratégia para a síntese de compostos organossulfurados. Dentre essa classe de compostos, destacam-se os *N,S*-acetais, devido às suas diversas aplicações farmacológicas, tais como, sedativos, inibidores de células cancerígenas, antibióticos β -lactâmicos, entre outros.¹¹⁴

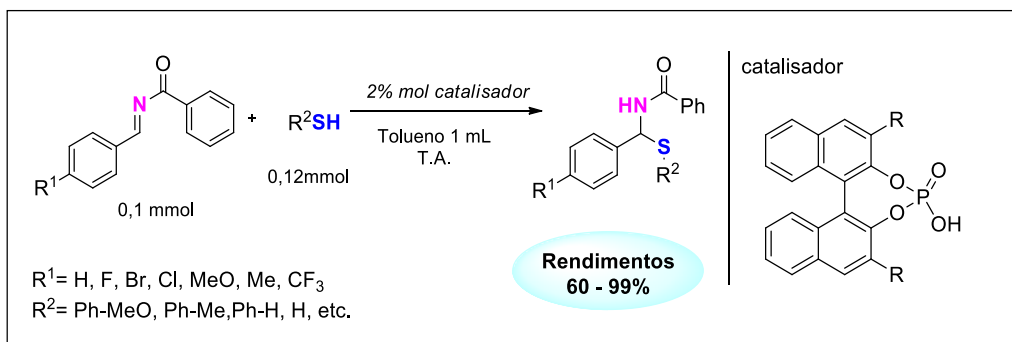
Os compostos *N,S*-acetais, especialmente os que contêm centros estereogênicos, desempenham um papel importante na bioquímica de muitos organismos vivos, e podem ser encontrados em uma gama de produtos naturais e moléculas medicinais. Dentre as várias metodologias utilizadas na síntese de compostos *N,S*-acetais, a adição de tióis a sulfonamidas tem atraído a atenção dos sintéticos. Devido ao valor agregado aos compostos contendo a ligação C-S novos progressos significativos foram desenvolvidos para obtenção destes. Por outro lado, as metodologias assimétricas para síntese de *N,S*-acetais são importantes motivos, devido a essa classe estar presente em uma ampla gama de compostos biologicamente ativos, produtos naturais e antibióticos os quais são muito menos explorados.¹¹⁵

Os *N,S*-acetais, constituem uma classe com valor atrativo, podendo ser encontrados principalmente em antibióticos, sedativos, inibidores da transcriptase reversa do HIV-1 (**Figura 7**). Além disso, alguns compostos artificiais contendo *N,S*-acetal apresentam interesse medicinal e uma vasta relevância sintética também foram relatadas.¹¹⁵

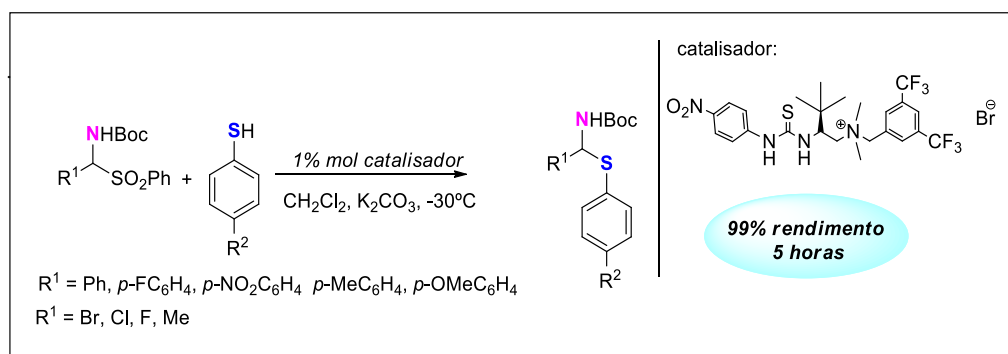
Figura 7. Principais moléculas biológicas contendo *N,S*-acetais.



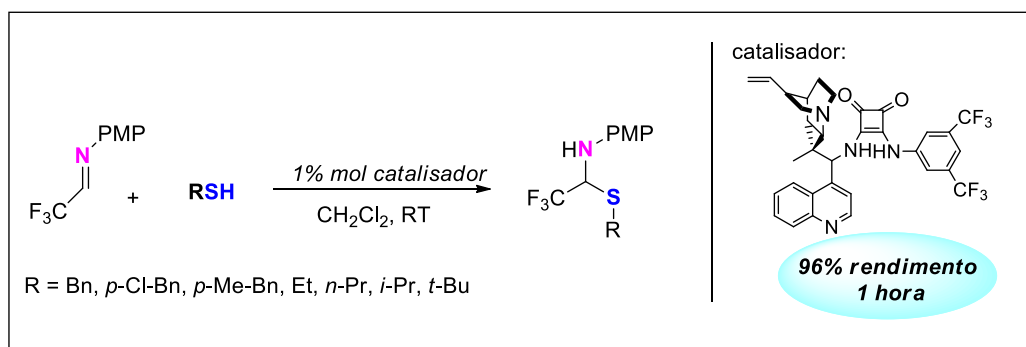
Nesse contexto, Antilla e colaboradores relataram o primeiro método catalítico assimétrico para a preparação de *N,S*-acetais quirais através da adição de tióis a *N*-acil iminas com um catalisador quiral promovida pelo derivado de ácido fosfórico, como demonstrado no **Esquema 3**. Os autores obtiveram rendimentos bons a excelentes, utilizando uma baixa carga de catalisador.¹¹⁶

Esquema 3. Metodologia descrita por Antilla e colaboradores para a síntese de *N,S*-acetais.


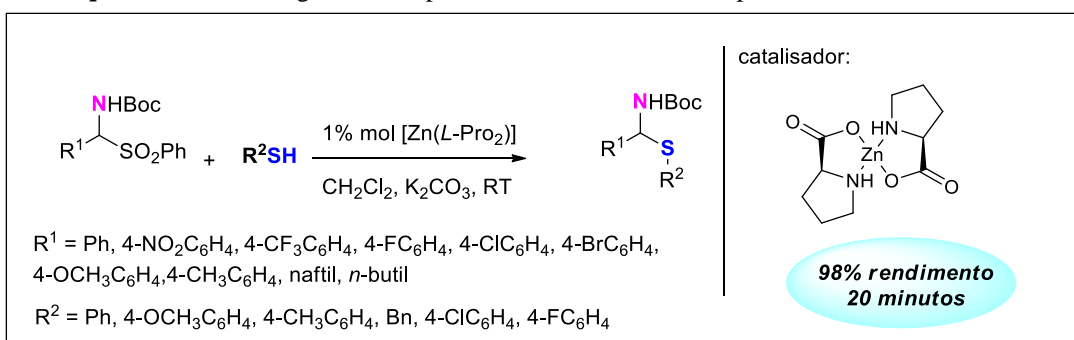
Posteriormente, Zhao e colaboradores reportaram a síntese eficiente de *N,S*-acetais catalisados por sais derivados de tiourea bifuncional. Os autores estudaram muitos catalisadores e, o melhor está descrito no **Esquema 4**. As reações foram realizadas utilizando 1% mol de catalisador, em meio de diclorometano, por um tempo reacional de 5 horas, obtendo-se rendimento de 99%.¹¹⁷

Esquema 4. Adição de tióis a iminas catalisada por derivados de tiourea.


Já Wang e colaboradores relataram a síntese de *N,S*-acetais com um organocatalisador, squaramida bifuncional. Para síntese dos *N,S*-acetais, os autores utilizaram 1% mol de catalisador (descrito no **Esquema 5**), em meio de diclorometano, durante um período reacional de 1 hora, obtendo-se rendimento de 96% (**Esquema 5**).¹¹⁸

Esquema 5. Metodologia descrita por Wang e colaboradores para a síntese de *N,S*-acetais.


A fim de descrever uma nova metodologia para a síntese de *N, S*-acetais, utilizando agora um catalisador de metal de transição, o nosso grupo de pesquisa apresentou um novo procedimento de baixo custo e altamente eficiente. Assim, Oliveira e colaboradores em 2017 conduziram a reação de adição de tióis a *N*-Boc sulfinamidas, catalisada por $Zn[(L)\text{-Prolina}]_2$, com uma baixa carga catalítica (1% mol) e sob condições de reação suaves em curto tempo reacional, conforme o **Esquema 6**.¹⁸

Esquema 6. Metodologia descrita por Oliveira e colaboradores para a síntese de *N,S*-acetais.


3. JUSTIFICATIVA

Diante de tantas variáveis, uma sistematização do conhecimento químico dos metais já foi em alguma extensão realizado. Esta evolução é clara, bela e muito elucidativa do modo como se constrói o conhecimento científico. Procurando assim inovar procedimentos, este trabalho utilizou enzimas e imobilização de lipase, com a finalidade de reduzir custos de processo, mantendo a qualidade do biocatalizador, além disso a posterior reutilização das enzimas em biocatálise justificou a realização deste trabalho, cujo o objetivo este trabalho em síntese, com a adição de 1,2-tióis catalisada por lipase às iminas, sob condições moderadas, e síntese em química de fluxo contínuo para *N,S*- Acetais.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Obtenção de compostos *N,S*-acetais utilizando biocatalisadores sob condições ambientalmente corretas, bem como desenvolver um sistema automatizado em fluxo contínuo para a síntese destes compostos, além de avaliar o potencial antioxidante e antitumoral dos mesmos.

4.2 Objetivos Específicos

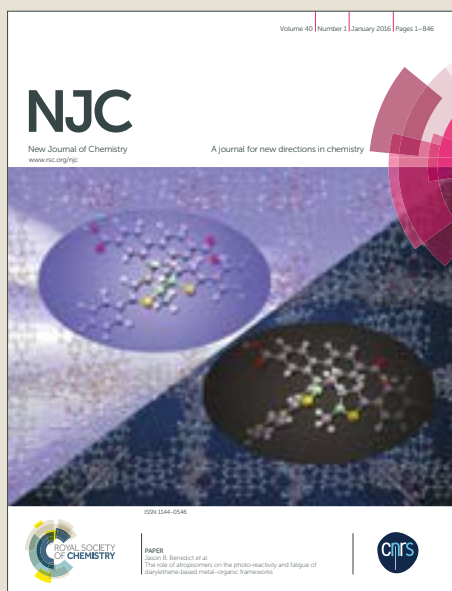
- ✓ Otimizar um processo de síntese de compostos *N,S*-acetais com diversas enzimas livres;
- ✓ Realizar a síntese de uma biblioteca de compostos *N, S*-acetais utilizando diferentes enzimas livres como biocatalisadores;
- ✓ Imobilização de enzimas para aplicação da metodologia em fluxo contínuo;
- ✓ Empregar o sistema de fluxo contínuo na obtenção de derivados *N-S*-acetais;
- ✓ Sintetizar uma biblioteca de compostos *N,S*-acetais em sistema de fluxo contínuo;
- ✓ Avaliar atividade antioxidante dos compostos sintetizados;
- ✓ Avaliar o potencial antitumoral dos *N-S*-acetais em células de linhagens (SK-Mel 19, Sk-Mel 28, and Sk-Mel 103).

NJC

Accepted Manuscript



This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: T. B. de Albuquerque, C. D. G. da Silva, A. R. Oliveira, B. F. dos Santos, B. A. L. da Silva, R. Katla, M. P. D. Rocha and N. L. D. C. Domingues, *New J. Chem.*, 2017, DOI: 10.1039/C7NJ03387G.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the [author guidelines](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the ethical guidelines, outlined in our [author and reviewer resource centre](#), still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.



Journal Name

ARTICLE

Lipase catalyzed 1,2-addition of thiols to imines under mild conditions

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Tábata B. Albuquerque,^a Caren D. G. da Silva, Aline R. de Oliveira,^a Beatriz F. dos Santos,^a Beatriz A. L. da Silva,^a Ramesh Katla,^a Mariana P. D. Rocha^a and Nelson L. C. Domingues^a

This is the first report of enzymes used as a biocatalyst for a 1,2-sulfur addition. In this study, we describe the *N,S*-acetals synthesis using an environmentally friendly process with low catalyst loading and in short reaction times using lipase pancreas porcine, chymosin, and bovine serum albumin (BSA). The hydrogen bond between the enzyme and the *N*-Boc imine is a key factor in this reaction.

Introduction

Biocatalysis research has exponentially grown over the last past decades owing to discoveries related to the synthesis of many compounds, mainly with biological properties, which are beneficial for the society.^{1,2} In addition, environmental concerns have driven many research groups around the world, and even industries, to describe new synthetic protocols that are not harmful for the environment and to consider the subproducts formed by side reactions. This results in the use of catalysts that allow faster reactions using low cost reactants and avoid the wastage of solvents, which have a great impact in the environmental factor (E factor).³ Thus, many protocols that use enzymes (e.g., lipases) have been reported. Enzymes possess great catalytic characteristics such as high efficiency, biodegradation (unlike heavy metals); in some cases, the chemical transformations occur in aqueous solutions, avoiding the use of polluting solvents.⁴ Moreover, such enzymes have great specificity and can be used both in free form or immobilized; they are usually cheap and stable catalysts and can be inserted as heterogeneous catalysts in organic reaction media.⁴ Many examples of enzymatic catalyzed reactions are described in the literature such as Mannich⁵, aldolic⁶, decarboxylative aldol and Knoevenagel⁷, Morita-Baylis-Hillman⁸, and sulfa-Michael^{4b} reaction.

The *N,S*-acetals, which are commonly found in a great range of biological products with medical and biochemical applications, have attracted great attention.⁹ An excellent example is penicillin, which belongs to the β -lactamics antibiotic family characterized by the therapeutic treatment. Penicillin prevents

several infectious processes and its complications with high efficacy and low cost.⁹ Another known antibiotic is Fuzaperazine A, which is naturally produced and broadly used against viruses, bacteria, and carcinogenic cells.⁹ Owing to their important applications, over the years, a great number of synthetic strategies aimed to produce new *N,S*-acetals molecules have been developed.⁹ Thiols were added to imines using thiourea quaternary ammonium salts as catalysts to obtain *N,S*-acetals derivatives.^{9a} *N,S*-acetals were synthesized using isatin and thiols, as well as isoindolinones and thiol derivatives with BINOL-phosphoric acid derivative as catalyst^{9b,9c}. The synthesis of *N,S*-acetals in high yields and excellent enantiomeric excess using chiral phosphoric acids were also reported^{9d}. We published a synthetic protocol to obtain some *N,S*-acetals using $Zn(Pro)_2$ as a heterogeneous catalyst¹⁰. However, to the best of our knowledge, no procedures are described for the synthesis of *N,S*-acetals using a biological catalyst such as enzymes. Since we have developed synthetic methods that use enzymes as catalyst, for example in the sulfa-Michael reaction^{4b}, we propose employing enzymes to synthesize some *N,S*-acetals under mild and green reaction conditions herein (Figure 1).

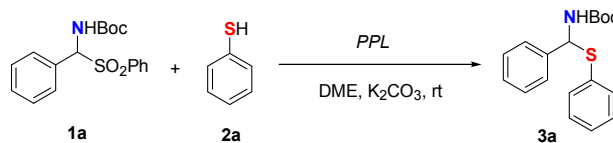


Figure 1. Reaction scheme for the *N,S*-acetal synthesis biocatalyzed by Porcine pancreas lipase (PPL).

^aOrganic Catalysis and Biocatalysis Laboratory (LACOB), Federal University of Grande Dourados, Itahúm rod. km 12 s/n°, Dourados, MS, Brazil. E-mail: nelsondomingues@ufgd.edu.br or nelsonluis.domingues@hotmail.com

† Footnotes relating to the title and/or authors should appear here.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

Experimental

General methods:

All the chemicals, reagents, and solvents were used as received unless otherwise stated. The respective reactions were monitored via thin layer chromatography (TLC) using MACHEREY-NAGEL silica plates (SIL G/UV254). The compounds were purified via column chromatography on silica gel. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 on a Bruker spectrometer (300 and 75 MHz, respectively). The infrared spectra were recorded on a FT/IR 4100 type A Jasco spectrometer.

General procedure for the *N*-Boc imines synthesis:

The mixture of aldehyde (5.0 mmol), sodium benzenesulfinate (5.0 mmol), *tert*-butyl carbamate (5.0 mmol), and HCO_2H (217 μL) was placed in a 50-mL round-bottom flask. CH_3OH (5 mL) and water (10 mL) were added, and the mixture was magnetically stirred at room temperature for 24 h. When the reaction was complete, the solid obtained was filtered, washed with ethyl ether, and dried overnight.

General procedure for *N,S*-acetal synthesis:

The mixture of thiol (0.2 mmol), amidosulfones (0.1 mmol), K_2CO_3 (0.5 mmol), and enzyme (0.01 g) in DME (4 mL) was placed in a tube at room temperature. The reaction was stirred using a magnetic bar and monitored using TLC (hexane/EtOAc, 90:10). After the reaction, the catalyst was separated via filtration, and the mixture was extracted with DCM (3×10 mL). The organic phases were combined and dried over anhydrous Na_2SO_4 ; the salt was filtered before concentrating the organic phase under reduced pressure. The product was purified via column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc, 90:10).

Results and discussion

We initially evaluated the effectiveness of the biocatalyst in different organic solvents such as ethyl acetate, THF, DCM, DME, and DMSO (Figure 2).

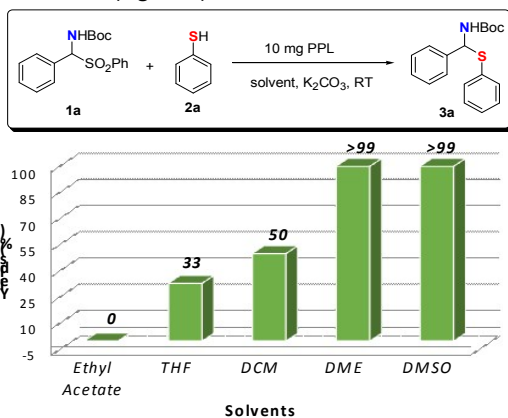


Figure 2. Yields for the *tert*-butyl (phenyl (phenylthio) methyl) carbamate (**3a**) catalyzed by PPL [reaction conditions: **1a** (0.1 mmol), **2a** (0.2 mmol), K_2CO_3 (0.5 mmol), solvent (4 mL), 2 h].

The reaction in ethyl acetate did not afford the desired compound. We concluded that this is likely because of the insolubility of compound **1a** in that solvent. Therefore, we also attempted to perform the *N,S*-acetal synthesis in DCM; however, the yield obtained was moderate (50%). To our surprise, when the solvents were DME and DMSO, we achieved a 100% yield. To further evaluate the biocatalyst effectiveness, a blank reaction (without biocatalyst) was performed in those two solvents. The reaction in DMSO occurred without PPL, affording 50% of the desired compound after 2 h. However, reaction in DME did not afford *N,S*-acetal even after 24 h. Therefore, DME was chosen as the solvent for the biocatalyzed reactions. The catalyst loading effect on the yield obtained was studied later (Table 1).

Table 1. PPL catalyst loading and yields for *N,S*-acetal synthesis*.

| Entry | Catalyst loading (mg) | Yield (%) |
|-------|-----------------------|-----------|
| 1 | - | - |
| 2 | 2.5 | 23 |
| 3 | 5.0 | 52 |
| 4 | 7.5 | 73 |
| 5 | 10.0 | >99 |

* Reaction conditions: **1a** (0.1 mmol), **2a** (0.2 mmol), K_2CO_3 (0.5 mmol), solvent (4 mL), 2 h.

The yield increased with the catalyst loading. As seen in Table 1, increasing the catalyst proportion from 0.0 to 10.0 mg resulted in a yield raise from 0.0 to >99%. These results indicate that a high yield can be obtained even at low catalyst loading (10.0 mg), which clearly demonstrates the effectiveness of the catalyst. Based on these deductions, the following standard protocol was established: *N*-Boc sulfonamide (0.1 mmol), thiol derivatives (0.2 mmol), K_2CO_3 (0.5 mmol), and DME (4 mL) for 2 h. This procedure was used for several other reactions involving different *N*-Boc sulfonamides and thiols (Table 2).

Table 2. Yields for the *N,S*-acetal synthesis biocatalyzed using PPL

| Entry | Thiol | Amidosulfone | Product | Yield ^a (%) |
|-------|-------|--------------|---------|------------------------|
| 1 | | | | 100 |
| 2 | | | | 100 |
| 3 | | | | 100 |
| 4 | | | | 80 |
| 5 | | | | 57 |
| 6 | | | | 55 |
| 7 | | | | 74 |
| 8 | | | | 43 |
| 9 | | | | 15 |

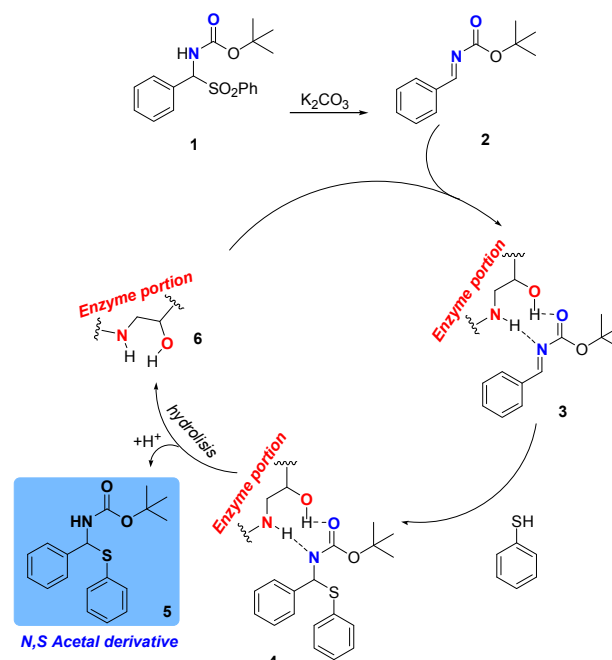
^a Yield calculated for purified compound after column chromatography.

The reactions involving thiols containing either H or electron withdrawing groups at the *para*-position (entries 1–3) afforded the highest yields compared to the ones with electron donor groups (entries 4–5). This fact was not expected; however, this is believed to be caused by the hydrogen bond between the nucleophiles and the acid hydrogen in the enzymes. We concluded that more basic sulfur species resulted in stronger hydrogen bond; thus, the addition of benzenethiol (entry 6), *p*-OCH₃ (entry 5) or *p*-CH₃ (entry 4) enables these nucleophiles to create strong hydrogen bond with enzyme's hydrogen acids.

Owing to this bond, the nucleophilicity of sulfur species decreased, and the yields for these reactants were low.

For the PPL, the mechanism shown in Figure 3, which is to the one described by Rizzo,¹¹ is proposed. Therein, the serine portion of the enzyme (hydrogen bond plus imine), which is obtained after the elimination of the sulfinic group in basic media, can activate the interaction for the 1,2-sulfur addition. As seen for the *N*-Boc sulphonamides derivatives, the hydrogen bond between the imine nitrogen and the enzymatic hydrogen (intermediate #3) made this intermediate more reactive toward the 1,2-sulfur attack. Hence, the derived conclusion is consistent with the data presented in entries 7–9 (Table 2). Moreover, when the imine had an electron withdrawing group, such as nitro, it enabled the attack of the sulfur species easier because of the mesomeric effect. This effect increased the electrophilicity of the imine carbon. Contrastingly, an electron donor group such as OCH₃ bonded at the phenyl group (entry 8, Table 2) or a simple alkyl group such as butyl (entry 9, Table 2) decreased the electrophilicity and resulted in a less effective hydrogen bond in the intermediate #3. It is important to note that certain reports in literature agree with this conclusion^{5,7}.

The feasibility to reuse the PPL in the *N,S*-acetal synthesis was also studied herein. However, as informed by Rizzo¹¹, we could not reuse the enzyme because of the presence of sulfinic base was inside the crude reaction. In addition, water could not be used to remove only the sulfinic base because the enzyme was also soluble in water.


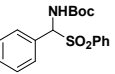


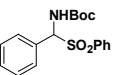
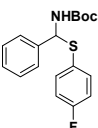

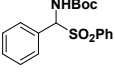
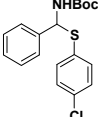

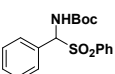
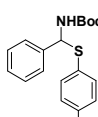

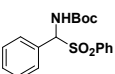
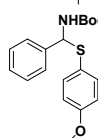
**Figure 3.** Proposed mechanisms for the *N,S*-acetal synthesis biocatalyzed by PPL

ARTICLE

Journal Name

To obtain a more comprehensive analysis of the *N,S*-acetal biosynthesis, we extended the study using two more enzymes such as chymosin and bovine serum albumin (BSA) (Table 3).

Table 3. Yields for the *N,S*-acetal synthesis biocatalyzed by chymosin (CHY) and albumin (ALB).

| Entry | Thiol | Amidosulfone | Product | Yield ^a (%) |
|-------|--|---|--|------------------------|
| 1 |  |  |  | 53 (CHY) 76 (ALB) |
| 2 |  |  |  | 93 (CHY) 100 (ALB) |
| 3 |  |  |  | 56 (CHY) 60 (ALB) |
| 4 |  |  |  | 86 (CHY) 96 (ALB) |
| 5 |  |  |  | 90 (CHY) 84 (ALB) |

^a Yield calculated for purified compound after column chromatography.

For these two enzymes, patterns related to the effect of the groups in the thiophenol moiety were not observed. However, we observed that both chymosin and BSA afforded high yields for the OCH₃ and CH₃ groups, contrary to the moderate yields observed in cases wherein PPL biocatalysis was performed. This observation corroborates with the conclusion for PPL regarding to the basicity as for the sulfur species and enzymes. To the best of our knowledge, the albumin structure presents a basic nature in its hydrophobic active site¹². Therefore, as observed in Table 3, basic sulfur species presented less interaction with enzyme and due to higher nucleophilicity of the sulfur species - as OCH₃ (entry 5) and CH₃ (entry 4) - the yields of these reactions were higher in comparison to the acidic ones, as hydrogen (entry 1). Furthermore, as chymosin presented almost the same results obtained for BSA, we extended the conclusion also for chymosin.

Conclusions

A new, simple, efficient, low cost, and green catalytic enzymatic protocol for the 1,2-sulfur addition to synthesize *N,S*-acetals involving PPL, chymosin, and BSA is described herein. To the best of our knowledge, the use of enzymes has

not been reported for this important reaction. Certain important aspects make this protocol a useful alternative to the existing methods for the synthesis of *N,S*-acetals: the reaction was achieved at short reaction times and room temperature, and high yields were obtained.

Acknowledgements

The authors (N. L. C. D and R.K.) thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) for financial support (Process: 314140/2014-0 and 400706/2014-8 CNPq - Brazil). The author (T. B. A and N. L. C. D) thank to Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/Brazil - Process: 59/300.439/2015-PAPOS REDE PRÓ-CENTRO-OESTE FASE III and Process: 59/300.138/2016- BIOTA/MS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Auxílio Nº 2209/2015, Processo Nº 23038.008241/2014-89, Programa CAPES-FAPCO) for financial support.

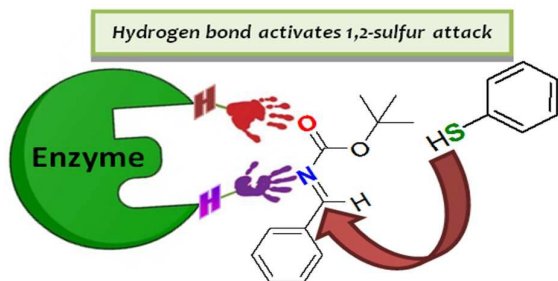
References

- C. Grondal, M. Jeanty. *Nature Chemistry*, 2010, **2**, 167-178
- C. R. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science*, 2010, **329**, 305-309.
- A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature*, 2001, **409**, 258-268; C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 81-87; C-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. E.d. Engl.*, 1989, **28**, 695-707; U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature*, 2012, **485**, 185-194; R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1437-1451; V. S. Ferreira-Leitão, M. C. Cammarota, E. C. G. Aguiaras, L. R. Vasconcelos de Sá, R. Fernandez-Lafuente, D. M. G. Freire, *Catalysts*, 2017, **7** (1), 9; doi:10.3390/catal7010009; F. Guo, P. Berglund, *Green Chem.*, 2017, **19**, 333-360.
- L. R. A. Lerin, R. A. Loss, D. Remonato, M. C. Zenevicz, M. Balen, V. O. Netto, J. L. Ninow, C. M. Trentin, J. V. Oliveira, D. Oliveira, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2014, **37**: 2381-2394; P. V. S. Rizzo, L. A. Boarin, I. O. M. Freitas, R. S. Gomes, A. Beatriz, A. W. Rinaldi, N. L. C. Domingues. *Tetrahedron Letters*, 2014, **55**, 430-434; E. Stavila, G. O. R. A. V. Ekenstein, A. J. J. Woortman, K. Loos, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 234-241; X. Garrabou, T. Beck, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int.*, 2015, **54**, 5609-5612; N. L. Eremeev, S. Y. Zaitsev. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2016, **13**, 78-85; K. S. Dalal, Y. A. Tayade, Y. B. Wagh, D. R. Trivedi, D. S. Dalal, B. L. Chaudhari, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 14868-14879; M. Lopez-Iglesias, V. Gotor-Fernandez. *Chem. Rec.*, 2015, **15**, 743-759; A. C. L. M. Carvalho, T. S. Fonseca, M. C. de Mattos, M. C. F. de Oliveira, T. L. G. de Lemos, F. Molinari, D. Romano, I. Serra. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**, 29682-29716.
- K. Li, T. He, C. Li, X-W. Feng, N. Wang, X-Q. Yu, *Green Chem.*, 2009, **11**, 777-779.

6. C. Li, Y-J Zhou, N. Wang, X-W. Feng, K. Li, X-Q Yu, *J. Biotechnol.*, 2010, **150**, 539–545.
7. (a) X-W. Feng, C. Li, N. Wang, K. Li, W-W. Zhang, Z. Wang, X-Q. Yu, *Green Chem.*, 2009, **11**, 1933–1936; (b) Y-F. Lai, H. Zheng, S-J. Chai, P-F. Zhang, X-Z. Chen *Green Chem.*, 2010, **12**, 1917–1918.
8. M.T. Reetz, R. Mondière, J.D. Carballeira *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 1679–1681.
9. H-Y. Wang, J-X. Zhang, D-D. Cao, G. Zhao., *ACS Catal.* 2013, **3**, 2218–2221; C. Bececo, P. Chauhan, A. Rembiak, A. Wang., *Adv. Synth. Catal.* 2015, **357**, 672 – 676; S. Josipa; D. Irena; G. Matija., *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 2071–2074; G. K. Ingle, M. G. Mormino, L. Wojtas, J. C. Antilla, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 4822–4825; H. Zhang, B. Wang, L. Cui, Y. Li, J. Qu, Y. Song., *Org. Biomol. Chem*, 2014, **12**, 9097–9100; H. Zhang, B. Wang, L. Cui, Y. Li, J. Qu, Y. Song., *Org. Biomol. Chem*, 2014, **12**, 9097–9100; C. L. Jarvis, M. T. Richers, M. Breugst, K. N. Houk, D. Seidel, *Org. Lett.*, 2014, **16**, 3556–3559; B-X. Feng, B. W. X. Li, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 9206–9209; R. A. Unhale, N. Molleti, N. K. Rana, S. D. S. Bhandary, V. K. Singh, *Tetrahedron Letters.*, 2017, **58**, 145–151.
10. A. R. de Oliveira, C. D. G. da Silva, R. Katla, M. P. D. Rocha, T. B. Albuquerque, V. L. Kupfer, A. W. Rinaldi, N. L. de C. Domingues, *Chemistry Select.* 2017, **2**, 4462–4465.
11. P. V. S. Rizzo, L. A. Boarin, I. O. M. Freitas, R. S. Gomes, A. Beatriz, A. W. Rinaldi, N. L. C. Domingues, *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 430–434.
12. D. C. M. Albanese, N. Gaggero, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 10588–10598; X. M. He, D. C. Carter, 1992, **358**, 209–215.

PPL, Chymosin and BSA as efficient biocatalysts (low catalyst loading, high yields) in an eco-friendly synthesis of *N,S*-acetal.

Graphical Abstract



Design of continuous flow-chemistry synthesis for *N,S*-acetals, and assessment against melanoma cancer cells

Tábata B. de Albuquerque,^a Beatriz A. L. da Silva,^a Beatriz F. dos Santos,^a Aline R. de Oliveira,^b David T. H. de Castro,^c Kely Picoli-Souza,^c Edson L. dos Santos,^c and Nelson L. C. Domingues^{*a}

Received 00th January
20xx,
Accepted 00th January
20xx

DOI:
10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

There is an increasing tendency from the researchers by the innovative, greener, and easy-handle reactors and catalysts. In this sense, herein we showed the design for the enzymatic reactor based on continuous flow chemistry applied in the *N,S*-acetal synthesis. In this study, we prove that the immobilization of LPP allowed us to perform, at least, four cycles, without any significant active enzymatic loss. The method showed as group tolerant either for thiol and amidosulfone counterpart as well. The *N,S*-acetals were assessed to determine their antioxidant property and the antitumor potential against melanoma cell lines SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-103, and B16F10-Nex2. Regarding oxidative property, we concluded that the electrons par into the sulfur atom is responsible for their oxidative property, and the compound from the sulfur oxidation (sulfone) does not present any significative carcinogenic property. On the other hand, the *N,S*-acetal presents some important antitumoral properties, and in some cases as an example to the *N,S*-acetal bearing methoxy group at phenyl group showed an important property (IC₅₀ and selectivity index) against B16F10-Nex2 metastatic melanoma cells.

Introduction

The way that organic reactions are performed traditionally has changed dramatically due to the advance of new environmental benign tools which have allowed organic chemists to perform reactions in greener and more economic new routes. In this sense, the flow system rises as a powerful tool for organic synthesis because this system can provide higher levels of control and automation when compared with the batch and bench system. Also, the growing use of the flow system in the laboratories brings some real advances in organic synthesis and through some adaptations makes it a scalable and easier process to apply directly in the industrial process.^{1,2} In this sense, the industrial sector has also changed their traditional plants or adopted them to new production ways, to afford more effectiveness, and consequently more profitable methodologies to get their interest chemical compounds.² Besides, the continuous flow system is one of the most applicable methodologies which gather the increasing of the yields, profit, and the adoption of the twelve green chemistry principles.²⁻⁴ One of the most important principle that the continuous flow systems claims are the safety because in this

systems the chemists can set up many reaction conditions applied to reactions using hazardous chemicals in controlled conditions, minimizing any contamination, and, therefore, increasing the human and environmental safety in the process.^{1,2} Allied to this, the use of continuous flow systems brings to the methodology some advantages such as energy and atomic efficiency, speed of reaction, assessment, reproductivity, reaction parameters control (temperature, pressure, time, flow), and waste reduction.^{1,2} Among the several advantages of flow chemistry, the use of biocatalysts receives great attention. In the last few decades, biocatalysis has emerged because it confers, among various advances, the environmental factor. Besides, biocatalysis is following ten of the twelve principles of the Green Chemistry,⁵ and it is a very elegant methodology to be executed because it can be allied to some other organic synthesis tools as microwave⁶ and ultrasound.^{7,8} Biocatalysis can be performed using enzymes and most of them are not stable in common reaction media with organic solvents. It is very known that enzymes require a quantity of water to maintain their quaternary structure and, therefore, their activity. The exception of this is Lipase which in some cases can maintain or improve the enzymatic activity.⁹⁻¹³ Regarding the activity of the enzyme, the reusability is an issue to overcome because some enzymes have their enzymatic activity affected after the first cycle of use. This causes some frustration for the researchers that always are seeking reusable catalysts. To overcome this issue, the chosen alternative by the researchers is enzyme immobilization. The immobilization of free enzymes is a well-known process, however, the enzyme activity is drastically reduced due to the effect of the support.¹⁴ This is because the immobilization

^a *a. Organic Catalysis and Biocatalysis Laboratory (LACOB), Federal University of Grande Dourados, Itahúm rod. km 12 s/n°, Dourados, MS, Brazil. E-mail: nelsondomingues@ufgd.edu.br or nelsonluis.domingues@hotmail.com*

^b *State University of Maringá*

^c *Research Group on Biotechnology and Bioprospecting Applied to Metabolism (GEBBAM), Federal University of Grande Dourados, Brazil*

† Footnotes relating to the title and/or authors should appear here.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

process can produce a modification in the enzyme structure.¹⁵ Thus, currently, studies in organic synthesis using continuous flow chemistry and biocatalysis are very appreciated and can produce some new methodologies for important organic compounds for example pharmacological interest compounds. In addition, an important tool for evaluating hypotheses and proving the pharmacological properties of chemical compounds are experimental models that use different cell lines. In this sense, herein we present an innovative study using immobilized enzyme on a continuous flow system for the synthesis of *N,S*-acetals as shown in Figure 1. It is noteworthy that the continuous flow system used is regarding type 4 as described by Kobayashi and co-workers¹⁶ which the catalyst is inside the reactor while the reagents passed by the catalyst.

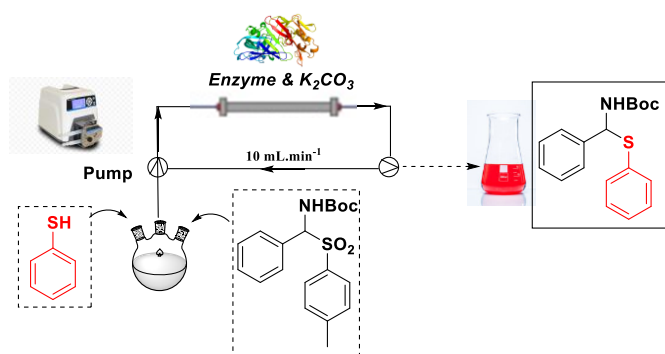


Figure 1. Scheme for the *N,S* acetal synthesis biocatalyzed by Lipase pancreas porcine (LPP).

Experimental

General methods:

All chemical reagents and solvents were used without any specific treatment. The respective reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) MACHEREY-NAGEL (SIL G / UV₂₅₄). The purification of the compounds was performed by column chromatography on silica gel. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ on Bruker (300 MHz and 75 MHz respectively) spectrometer. The infrared spectra were recorded on FT/IR 4100 type A spectrometer of Jasco.

General procedure for the amidosulfones:

In a 50 mL bottle flask was added aldehyde (5.0 mmol), sodium benzenesulfinate (5.0 mmol), *tert*-butyl carbamate (5.0 mmol) e HCO₂H (217 μL). The mixture was magnetically stirred in CH₃OH (5 mL) and water (10 mL) at room temperature for 24 hours. After completion, the solid was filtered off and washed with ethyl ether, and dried overnight.

Lipase pancreas porcine immobilization over magnesium organosilicate:

The MgCl₂ support synthesis was performed by following the reports published by Jasra and co-workers.¹⁷ MgCl₂ (8.36 g) was dissolved in a beaker containing methanol

(200 mL) and the solution was stirred at 25 °C for 10 minutes. In another beaker, APTES (9.8 g, 10.35 mL) was dissolved in methanol (50 mL). This solution was added dropwise to the MgCl₂ solution, with the resulting mixture forming a white suspension. Then, 0.5 M NaOH solution was slowly added until the pH reached 10.5 under stirring at 25 °C. The suspension obtained was aged for 1 week at 25 °C and the gel formed was centrifuged, washed with distilled water, and dried at 65 °C. After that, the immobilization process was performed by the adaptation of the process described by Demir e co-workers¹⁸. In a beaker, 1 g of the magnesium organosilicate, and 25 mL of glutaraldehyde were added and the suspension was stirred for 1 hour at room temperature. The suspension was filtered off aiming to remove all the glutaraldehyde and the solid was washed using distilled water (3 times). The resulting solid was transferred to a 50 mL beaker and added a solution of 0,45 g of Lipase pancreas porcine dissolved in 10 mL of distilled water. The mixture was stirred by orbital shaker for 12 hours at room temperature, filtered off, and washed with distilled water (25mL x 3 times). The immobilized enzyme was dried in a vacuum for 24 h and maintained refrigerated at 5 °C until its use.

General procedure for *N,S*-acetal synthesis:

A 100 mL round bottom flask was charged with thiol (0.2 mmol), amidosulfones (0.1 mmol), in CH₃CN (20 mL), at room temperature. To the flask was inserted a MasterFlex 96412-14 tubing with 10 cm and also connected on the other edge to the polypropylene column filled with the mixture between enzyme and K₂CO₃ (the column was made by us, with 8 mm of internal diameter, two filters at the end and at the beginning of the column. The total length of the column was 5 cm). The other edge of the column was connected to another 10 cm tubing and also re-inserted into the 100 mL flask. The continuous flow was set using a MasterFlex L/S 14 pump connected to the second 10 cm tubing after the column. The flow rate was set at 10.0 mL/min. The reaction was monitored by TLC (eluent: hexane/ EtOAc, 90:10). When the starting materials were consumed, the crude mixture was extracted with DCM (3x10 mL). The organic layers were combined, dried over anhydrous Na₂SO₄; the salt was filtered off and the organic phase was concentrated under reduced pressure. The product was purified by column chromatography on silica gel (eluent: hexane/ EtOAc, 90:10).

Results and discussion

First of all, we sought a simple and robust reaction set up to make ease the reaction, the removal of the catalyst, and the change of the catalyst loading. Thus, all the ancillaries used are mobile and able to sit alongside standard laboratory equipment (*e.g.* syringe/peristaltic pumps, glassware, in-line filters, back-pressure regulators, separators). We rationally designed the reaction set up based on the activity of the catalyst. It is very known that the immobilization of the catalysts confers the decreasing of the catalytic effect¹⁴. Thus, we assessed the catalytic

activity of the immobilized enzyme by the hydrolysis of the 4-nitrophenyl acetate as described by Park and co-workers.¹⁹ For the initial screening support, we used the free enzyme LPP and the immobilized LPP using 1.0 mM substrate and 0.1 g of support or enzymes in BES buffer (pH 7.2), and the reaction was monitored at 366 nm for maximum absorbance for 4-nitrophenol. The initial absorbance at 405 nm for 4-nitrophenyl acetate has changed considerably only for the free enzyme reaction after the 24h indicating that 4-nitrophenyl acetate was hydrolyzed (Figure 2).

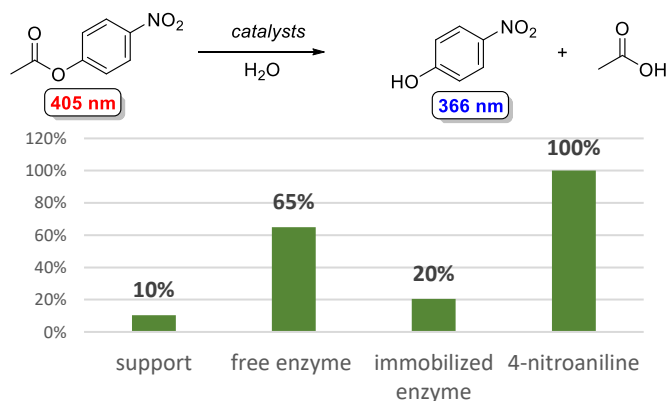
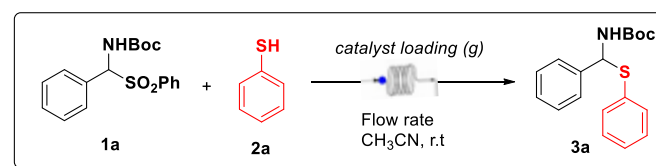


Figure 2. Enzyme activity measurement, in 24h, at 366 nm for magnesium organosilicate (support), lipase (free enzyme), immobilized lipase (immobilized enzyme), and for the 4-nitrophenol at 0.1 mM

For the support and the immobilized enzyme, the measurement at 366 nm presented only a low activity for both even in 48 h. Interestingly, the activity of immobilized enzyme has dramatically decreased compared to the free enzyme, and to the best of our knowledge, it occurs because of the changes that the support causes in the enzyme structure due to the support-enzyme interaction.

As far as we obtained the hydrolysis data, we started the assessment of the biocatalytic process for *N,S*-acetal synthesis. It is noteworthy that for free enzymes, especially for lipases, a process that uses mechanical stirring prevents the reuse of enzymes. Thereby, the design of the flow set up to use biocatalysts which possibilite the change of the biocatalyst when it loses its activity is very important. So, we designed a short glass column which was filled with the biocatalyst (Table 1) and the crude reaction in acetonitrile was going through the column with a flow rate of 10 mL/min by 3h. Thus, we assessed the effect of the catalyst loading over the yields. Firstly, the blank reaction was performed, and, at the end of this reaction, even in 6h, the interesting product was not obtained.

Table 1. Catalyst loading and yields for *N,S*-acetal synthesis catalyzed by LPP*.



| Entry | Catalyst loading (mg) | Yield (%) |
|-------|-----------------------|-----------|
| 1 | - | - |
| 2 | 0,1 | 80 |
| 3 | 0,05 | 83 |
| 4 | 0,025 | >99 |


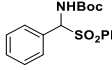
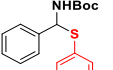

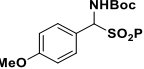
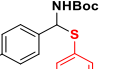

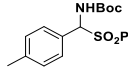
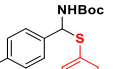

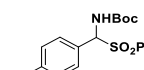
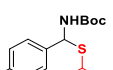

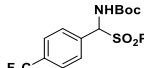
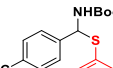

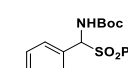
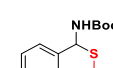

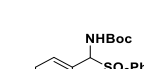
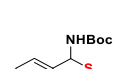

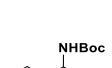
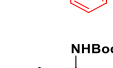

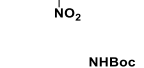
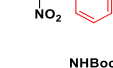


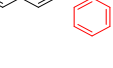

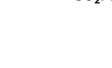
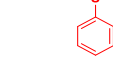


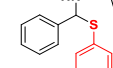


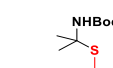
*Reaction conditions: **1a** (0.1 mmol), **2a** (0.2 mmol), K_2CO_3 (0.5 mmol) and solvent (20 mL), flow rate 10 mL/min for 3h.

Surprisingly, when we used the flow methodology with 0.1 g of the immobilized enzyme into the column, 80% of the *N,S*-acetal was obtained. We decided to decrease the biocatalyst loading and interestingly when we change the catalyst loading from 0.1 g to 0.025 g quantitative yield for *N,S*-acetal product was obtained (>99%). However, this observation is often observed for enzymes, and our group has described the same effect for the thia-Michael reaction⁹.

This data has encouraged us to proceed to synthesize other examples for *N,S*-acetals because, to the best of our knowledge, only a few reports have been published aiming at *N,S*-acetal synthesis using enzymes as biocatalysts. Besides, it is very known that *N,S*-acetals are presented in some numerous biologically active natural products, such as the penicillium fungi derivative penicillin, fuzaperazine A the fungal metabolites epi-dithiodioxopiperazines, and the epi-dithioketopiperazine alkaloid (+)-11,11'-dideoxyverticillin A, all of them containing *N,S*-acetal subunit.²⁰ However, the construction of *N,S*-acetals yet remains mainly thought to synthesized biological compounds in organic synthesis. Thus, we extended the method to other counter partners for this reaction, and the data is presented in Table 2.

We observed that this method tolerates many groups bearing to the *N*-Boc-protected amidosulfones. We performed these reactions using donor and electron-withdrawing groups and for all these circumstances we obtained high yields (entries 1 to 10). This method also afforded high yields even when it was used hindered groups such as naphthyl (entry 9).

Table 2. Yields for the *N,S*-acetal synthesis biocatalyzed by immobilized lipase.

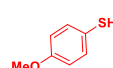
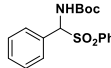
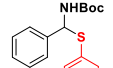

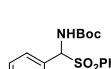
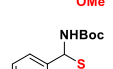

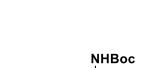
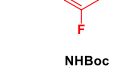
| Entry | Thiol | Amidosulfone | Product | Yield ^a (%) |
|-------|---|---|---|------------------------|
| 1 |  |  |  | >99 |
| 2 |  |  |  | 86 |
| 3 |  |  |  | 90 |
| 4 |  |  |  | 83 |
| 5 |  |  |  | >99 |
| 6 |  |  |  | 77 |
| 7 |  |  |  | 86 |
| 8 |  |  |  | 80 |
| 9 |  |  |  | 83 |
| 10 |  |  |  | 83 |
| 11 |  |  |  | NR |
| 12 |  |  |  | NR |
| 13 |  |  |  | NR |

^a Yield calculated for purified compound by chromatographic column.

We also carried out the reaction using an alkyl *N*-Boc-protected amidosulfones (entry 10) and the yield was good (83%). Surprisingly, when we assessed the effectiveness of the reaction using other nitrogen protecting groups as tosyl (entry 11), *N*-Boc ketimine (entry 12), or *N*-Boc aldimine (entry 13) the product was not obtained in all of these reactions. We concluded that the overlap between the nitrogen isolated ion pair and the π^*_{CO} system plays a mandatory role in this catalysis which increases the positive charge to the hydrogen bearing to nitrogen which is necessary to interact to the catalyst and it is strongly associate to removal of sulfonate group ($-SO_2Ph$) and addition of thiol.

Further, we extended this method changing the group bearing in *N*-Boc-protected amidosulfones as well as thiophenol. The data is presented in Table 3.

Table 3. Effect of the thiol substituent for the *N,S*-acetal synthesis

| Entry | Thiol | Amidosulfone | Product | Yield ^a (%) |
|-------|---|--|---|------------------------|
| 1 |  |  |  | 93 |
| 2 |  |  |  | >99 |
| 3 |  |  |  | 93 |

^a Yield calculated for purified compound by chromatographic column.

Again, the method shows good efficiency to synthesize *N,S*-acetals because the yields obtained by the change of the group bearing as in the amidosulfone as well as in thiol were excellent, even for the reaction between the deactivated amidosulfone bearing OMe and the low nucleophilic 4-fluorothiophenol (entry 3). In other words, this method supports many counter partners in both starting materials highlighting a great variety of compounds that can be done. It is noteworthy that some compounds presented here were obtained in low yields when was used free LPP in our previous work¹⁰ e.g. entry 2, 6, 7, and 13 (Table 2), and entry 1 (Table 3).

In this sense, and with this information in hand, to prove that this method is viable and advantageous to synthesize *N,S*-acetals we turned our attention to the literature aiming to compare our method to the other researches, and the data is disclosed in Table 4.

Table 4. Comparison of methods described in the literature for tert-butyl-1-(phenyl(phenylthio)methyl)carbamate (Entry 1–Table 2)

| Entry | Reaction conditions (temperature, catalyst, solvent, time) | Yield (%) |
|-------------------|--|--------------|
| 1 ^[20] | -30° C, thiourea–quaternary ammonium salts, CH ₂ Cl ₂ , 5h | 75 |
| 2 ^[21] | r.t., Zn(L-Pro) ₂ , CH ₂ Cl ₂ , 20 min | 98 |
| 3 ^[10] | r.t., Pancreas porcine Lipase (LPP), DME, 2h | >99 |
| This work | r.t., immobilized LPP, acetonitrile, 3h | >99 |

The work performed by Zhou and co-workers presented the synthesis of *N,S*-acetal using organocatalysis, however, the temperature used was -30° C for 5h. Moreover, the CH₂Cl₂ is a halogenate solvent which is not following the Green Chemistry Principles. Entries 2 and 3 regards the researches of our group. In entry 2, the *N,S*-acetal synthesis was performed for the first time using Zn(L-Pro)₂ as heterogeneous catalyst. Even to the low reaction time (20 min) the solvent used is the same for Zhou publication. Furthermore, we did not reuse the catalyst once there was not possible to separate it from the base used in the reaction. Entry 3 was a former work performed by us, for the first time using some free enzymes (LPP, Chymosin, Albumin) for the *N,S*-acetal synthesis in DME as the solvent. However, even the yields afforded by this method were high in considerable reaction time, the biocatalyst could not be recovered. In this currently developing method, we aimed to reuse the catalyst, thus, we assessed the effectiveness of the immobilized enzyme in five cycles as described in Figure 3. We performed five cycles reusing the immobilized LPP enzyme and to our delight the yields remained almost unchanged for four cycles and only in the fifth cycle, the yield decreased but remained as a good yield (75%). This was a huge advance on the use of immobilized LPP because the free enzyme can not be reused in the *N,S*-acetal synthesis using reaction flask.¹⁰

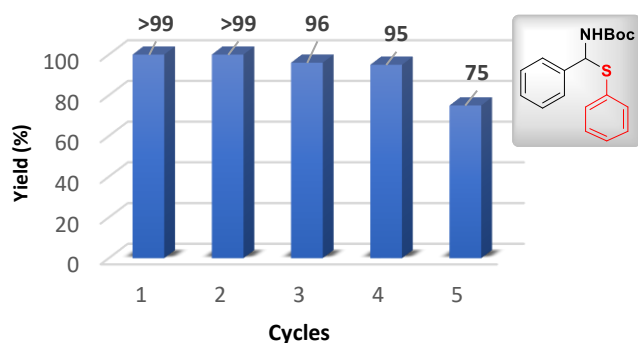


Figure 3. Immobilized LPP reuse cycles for the synthesis of tert-butyl(phenyl(phenylthio)methyl)carbamate

Other important data found in the literature for *N,S*-acetal claims that this class of compounds presents some biological properties given to this *N,S*-acetal subunit. However, only for a few more complex *N,S*-acetal structures some biological studies were done.²² Here we aimed to study some compounds against metastatic melanoma cancer cell lines (SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-103, and B16F10-Next2.). First of all, it is very known that organosulfur compounds can act as antioxidant molecules and, thus, inhibiting antimutagenic and anticarcinogenic activities in the extracellular environment and nontarget or target cells. This action has a relationship with some DNA-dependent nuclear enzymes.²³ Thus, some sulfur-containing molecules can prevent the mutation of healthy cells by mutagens and carcinogens species, for example, ROS species, trapping these mutagens species, or by chemoprevention allowing the healthy organism to be refractory to these species.²³

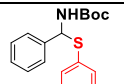
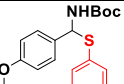
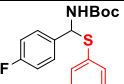
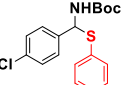
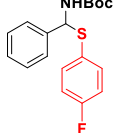
In this perspective, we assessed the scavenging potential for five molecules for stable DPPH radicals as described by Flora and co-workers,²³ with some modifications. The data is presented in Table 5.

We observed that any studied compound presented a similar antioxidant property than controls BHT and ascorbic acid. In this case, it is important to quote that this antioxidant property, in this case, could be associate with the ability to exchange mainly hydrogens (N-H) or lone pair from the sulfur atom.

Further, we assessed the cancer potential of these molecules against some cancer cells. First of all, we assessed the anticancer property for SK-Mel 19, Sk-Mel 28, and Sk-Mel 103 cells (Table 6).

We observed for SK-Mel 19 cells that even the IC₅₀ could be low (entry 4 in 48 h) the selectivity index (SI), which is calculated by the IC₅₀ for the human fetal lung fibroblast cells (MRC-5 Line), cells of non-tumor origin. IC₅₀ for the cancer cell line indicates to us that there is no selectivity for the tumor cell. Only in the case of compound 2 in 48 h presented 56% more selectivity for Sk-Mel 19 cells. It is a good indication that this molecule could be used associated with another drug, being a long-term effect on the body. In other words, this compound is time-dependent to increase its biologic property. The same analysis for Sk-Mel 28 cells indicates that entries 1 and 2 presented good results. Entry 1 presented 74% more selectivity for tumor cells even in 24 h and kept this selectivity, even with decay, for 48 h (14% selectivity for 48 h). However, it is important to quote that the IC₅₀ dropped down from 24 h to 48 h (114.2 ± 2.5 μM to 79.0 ± 0.7 μM) and this molecule besides been selective decreases its IC₅₀ which can get us to use it for long-term decreasing also the IC₅₀, and possibly its side-effects associated with its use against Sk-Mel 28 cells.

Table 5. Percentage of maximum scavenging activity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) to concentrations of 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ of the compounds.

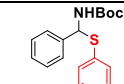
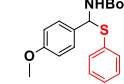
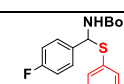
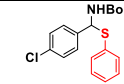
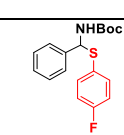
| Entry | Compound | % Maximum activity in each concentration | | |
|-------|---|--|---------------------|----------------------|
| | | 25 $\mu\text{g/mL}$ | 50 $\mu\text{g/mL}$ | 100 $\mu\text{g/mL}$ |
| 1 |  | 24.8 \pm 0.6 | 36.5 \pm 0.4 | 53.0 \pm 1.2 |
| 2 |  | 33.7 \pm 0.3 | 49.8 \pm 1.3 | 79.7 \pm 1.1 |
| 3 |  | 31.2 \pm 0.4 | 44.3 \pm 0.6 | 64.4 \pm 0.4 |
| 4 |  | 24.4 \pm 2.4 | 41.6 \pm 0.2 | 62.7 \pm 0.3 |
| 5 |  | 27.4 \pm 0.6 | 41.3 \pm 0.5 | 67.7 \pm 0.5 |
| 6 | BHT | 44.1 \pm 1.8 | 60.0 \pm 0.9 | 74.8 \pm 2.3 |
| 7 | Ascorbic acid | 94.9 \pm 0.7 | 95.1 \pm 0.7 | 95.5 \pm 0.5 |

Entry 2 presented, as previously cited for Sk-Mel 19 cells, the increase of the selectivity (56%) in 48 h and the decreasing of the IC_{50} from 24 h to 48 h (2.43 times). Again, it indicates this is a promising long-term using molecule.

The study for Sk-Mel 103 cells indicates that the molecule presented in entry 1 presented the high selectivity in the study of the Sk-Mel cell (1.95) in 24 h. It is important to quote that the compound in entry 5 presented the lower IC_{50} for all Sk-Mel cells.

To our delight, all the compounds tested against the B16F10-Next2 cells (Table 7) presented good results with less than 100 mM of IC_{50} with highlighting the data for entry 4 in 24 h. The chlorine compound showed more than twice times selective for this stain in a short study time. This data is very important because with the lower molecular mass this compound can be a model for further studies. Besides, entries 3, 2, and 1 respectively also presented higher selectivity of entry 4 reaching more than three times of selectivity for entry 3 in lower IC_{50} . Interestingly for entry 3, that the selectivity is lost along the time from 24 h to 48 h. The IC_{50} decreased by almost 10% from 24 h to 48 h and the selectivity decay was 0.46 from 2.93 in 24 h to 2.46 in 48 h.

Table 6. SK-Mel-19 cells inhibitor activity from *N,S*-acetals for 24 hours, and 48 hours.

| Entry | Compound | SK-MEL-19 Cells | | | | SK-MEL-28 Cells | | | | SK-MEL-103 Cells | | | |
|-------|---|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
| | | IC_{50} (μM) 24h | SI^a | IC_{50} (μM) 48h | SI^a | IC_{50} (μM) 24h | SI^a | IC_{50} (μM) 48h | SI^a | IC_{50} (μM) 24h | SI^a | IC_{50} (μM) 48h | SI^a |
| 1 |  | 175.8 \pm 9.8 | 1,13 | 96.1 \pm 4.7 | 0,93 | 114.2 \pm 2.5 | 1.74 | 79.0 \pm 0.7 | 1.14 | 102.1 \pm 3.3 | 1,95 | 106.6 \pm 5.6 | 0,84 |
| 2 |  | 294.0 \pm 16.6 | 0,92 | 131.2 \pm 3,9 | 1,56 | 317.8 \pm 1.0 | 0,85 | 130.6 \pm 3.9 | 1,56 | 302.1 \pm 14.6 | 0,90 | 279.8 \pm 6.0 | 0,73 |
| 3 |  | 203.8 \pm 1.3 | 0,93 | 107.4 \pm 4,1 | 0,79 | 150.0 \pm 3.2 | 1.24 | 96.3 \pm 4.4 | 0,88 | 172.3 \pm 12.4 | 1,08 | 83.7 \pm 5.0 | 1,04 |
| 4 |  | 179.0 \pm 15.5 | 0,56 | 85.3 \pm 5.2 | 0,81 | 185.9 \pm 7.6 | 0,54 | 120.5 \pm 10.9 | 0,57 | 153.8 \pm 2.4 | 0,65 | 150.3 \pm 3.5 | 0,46 |
| 5 |  | 145.8 \pm 4.1 | 0,92 | 94.5 \pm 1.4 | 1,02 | 95.4 \pm 4.3 | 1.41 | 111.6 \pm 8.1 | 0,86 | 137.1 \pm 2.2 | 0,98 | 77.7 \pm 2.9 | 1,23 |

a. $\text{SI} = \text{IC}_{50}$ for the healthy cell (MCR-5 cells) / IC_{50} for each one of the melanoma cancer cells.

Although we observed this selectivity loss, the IC_{50} remains almost unchanged in both studied times (24 and 48 h).

A glad exception was observed for entry 2 where both IC_{50} and selectivity have a slight decrease (ca 10%), presenting high selectivity for these cells as 24 as 48 h, and the small IC_{50} .

Table 7. B16F10-Next2 cells inhibitor activity from *N,S*-acetals during 24 hours and 48 hours

| Entry | Compound | B16F10-Nest2 cells | | | |
|-------|----------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| | | IC_{50} (μ M) 24h | SI^a | IC_{50} (μ M) 48h | SI^a |
| 1 | | 68.8 \pm 2.1 | 2.90 | 68.2 \pm 2.9 | 1.31 |
| 2 | | 91.8 \pm 2.6 | 2.94 | 82.2 \pm 3.6 | 2.48 |
| 3 | | 59.4 \pm 3.5 | 3.13 | 76.8 \pm 5.9 | 1.10 |
| 4 | | 42.6 \pm 2.4 | 2.34 | 49.2 \pm 3.3 | 1.40 |
| 5 | | 74.4 \pm 2.9 | 1.82 | 84.0 \pm 4.1 | 1.14 |

Aiming to shed light on which part of this molecule is basically responsible for the antitumor property we performed the oxidation of the sulfur affording, thus, the sulfone and the data are presented in Figure 4.

As observed in Figure 4 when we oxidized the sulfur atom to its sulfone the oxidative activity, as well as the antitumor activity against B16F10-Nex2 cells, decreased dramatically. We can conclude that the antioxidative property is strongly associated with the lone pairs in sulfur atom not with the hydrogen bearing to nitrogen. It is very important to quote that the capability of scavenger the radicals, in this case for *N,S*-acetals, probably did not change the pH of the system by hydrogen exchanging as for BHT or ascorbic acid. Another important aspect raised by this part of the study is the product from radical scavenger *N,S*-acetal loses its antitumor capability and it is innocuous for MRC-5 fibroblast cells. In other words, the use of this compound as a radical scavenger does not produce a hazardous compound/product.

In the same sense, the antitumor activity is strongly associated with sulfur lone pairs, and we can observe the almost entire loss of the activity for sulfone compound against B16F10-Nex2. This highlighted the structure effect observed, mainly for B16F10-Nex2 can be tuning to

reach better results inserting other donor groups (e.g. $N(CH_3)_2$) bonded to both, phenylthiol motif and also to the phenyl group, which could lead to best results as well as in decreasing more the IC_{50} and increasing the SI for this type cell.

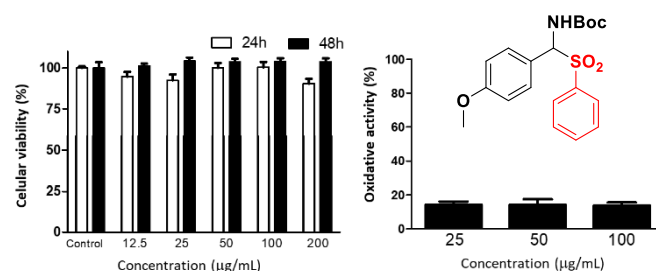


Figure 4. *N,S*-acetal versus sulfones for the inhibited the proliferation of B16F10-Nex2 cells.

Conclusions

In summary, we developed a new synthetic strategy to perform the synthesis of *N,S*-acetal using immobilized LPP in an organic medium. This method tolerates many organic groups (donor and withdrawing ones) for the process using a low immobilized LPP biocatalyst in a short reaction time. The immobilization of the biocatalyst led us to reuse it easily for, at least 4 cycles with almost no significant loss in the yields. Another achievement obtained from this study was the assessment data for the *N,S*-acetal products as antioxidant and antitumor against melanoma cells (SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103, and B16F10-Nex2) properties. The compounds showed that both the antioxidant and antitumor properties are strongly associated with sulfur lone pairs, and donor groups bonded to the phenyl group can increase the antioxidant and antitumor activity of the compounds, and the compounds bearing methoxy group at the phenyl ring showed as a promissory compound against B16F10-Nex2 metastatic melanoma cells with almost remains its activity/selectivity for 48 h.

Acknowledgements

The authors (N. L. C. D and R.K.) thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) for financial support (Process: 314140/2014-0 and 400706/2014-8 CNPq - Brazil). The author (T. B. A and N. L. C. D) thanks to Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul for scholar support (FUNDECT/Brazil - Process: 59/300.439/2015-PAPOS REDE PRÓ-CENTRO-OESTE FASE III) and financial support (Process: 59/300.138/2016-BIOTA/MS). Furthermore, the author (K.P.S and E.L.S) thanks to CNPq and FUNDECT.

References

- 1 J. A. M. Lummiss, P. D. Morse, R. L. Beingessner and T. F. Jamison, *Chem. Rec.*, 2017, **17**, 667–680.
- 2 R. Porta, M. Benaglia and A. Puglisi, *Org. Process Res. Dev.*, 2016, **20**, 2–25.
- 3 M. R. Chapman, M. H. T. Kwan, G. King, K. E. Jolley, M. Hussain, S. Hussain, I. E. Salama, C. González Nino, L. A. Thompson, M. E. Bayana, A. D. Clayton, B. N. Nguyen, N. J. Turner, N. Kapur, A. J. Blacker, *Org. Process Res. Dev.*, 2017, **21**, 1294–1301.
- 4 S. G. Newman and K. F. Jensen, *Green Chem.*, 2013, **15**, 1456–1472.
- 5 R. A. Sheldon and D. Brady, *ChemSusChem*, 2019, **12**, 2859–2881.
- 6 S. Horikoshi and N. Serpone, *Chem. Rec.*, 2019, **19**, 118–139.
- 7 M. M. Delgado-Povedano and M. D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **889**, 1–21.
- 8 S. S. Nadar and V. K. Rathod, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, **33**, 1–12.
- 9 P. V. S. Rizzo, L. A. Boarin, I. O. M. Freitas, R. S. Gomes, A. Beatriz, A. W. Rinaldi and N. L. C. Domingues, *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 430–434.
- 10 T. B. Albuquerque, C. D. G. Da Silva, A. R. De Oliveira, B. F. Dos Santos, B. A. L. Da Silva, R. Katla, M. P. D. Rocha and N. L. C. Domingues, *New J. Chem.*, 2018, **42**, 1642–1645.
- 11 U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore and K. Robins, *Nature*, 2012, **485**, 185–194.
- 12 A. M. Klibanov, *Biotechnol. Biol. Front.*, 2019, 230–241.
- 13 M. T. Reetz, P. Soni, L. Fernández, Y. Gumulya and J. D. Carballeira, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 8657–8658.
- 14 (a) J. Wachtmeister, P. Mennicken, A. Hunold, D. Rother, *ChemCatChem* 2016, **8**, 607–614; (b) D. Uhrich, H. Y. Jang, J. B. Park, J. von Langermann, *J. Biotechnol.* 2019, **289**, 31–38; (c) (d) A. Rouf, V. Kanojia, H. R. Naik, *Int. J. Chem. Stud.* 2017, **5**, 1817–1824
- 15 N. F. Mokhtar, R. N. Z. R. A. Rahman, N. D. M. Noor, F. M. Shari, and M. S. M. Ali, *Catalysts* 2020, **10**, 744–761; (b) C. L. B. Reis, E. Y. A. Sousa, J.F. Serpa, R. C. Oliveira and J. C. S. dos Santos, *Quim. Nova*, 2019, **42**, 768–783
- 16 T. Tsubogo, H. Oyamada and S. Kobayashi, *Nature*, 2015, **520**, 329–332.
- 17 H. A. Patel, S. K. Sharma, R. V. Jasra, *J. Molec. Catal. A: Chemical* 286, 31–40, 2008.
- 18 S. Demir, S. B. Gök, M. V. Kahraman, *Starch*, **64**, 3–9, 2012.
- 19 S. Jung, J. Kim and S. Park, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 2590–2594.
- 20 H-Y Wang, J-X. Zhang, D-D Cao, and G Zhao, *ACS Catal.* 2013, **3**, 10, 2218–2221
- 21 A. R. de Oliveira, C. D. G. da Silva, R. Katla, M. P. D. Rocha, T. B. Albuquerque, V. L. Kupfer, A. W. Rinaldi, N. L. C. Domingues, *ChemistrySelect*, 2017, **2**, 4462–4465
- 22 (a) B-X Feng, B. Wang, X. Li, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 9206–9209, (b) M. I. L. Soares, A. F. Brito, M. Laranjo, J. A. Paixão, M. F. Botelho, T. M. V. D. Pinhoe Melo, *Eur. J. Med.Chem.*, 2013, **60**, 254; (c) C. Bececo, P. Chauhan, A. Rembiak, A. Wang, *Adv. Synth. Catal.*, 2015, **357**, 672–676; (d) S. Josipa, D. Irena and G. Matija, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 2071–2074; (e) G. K. Ingle, M. G. Mormino, L. Wojtas, J. C. Antilla, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 4822–4825; (f) H. Zhang, B. Wang, L. Cui, Y. Li, J. Qu, Y. Song, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 9097–1000; (g) H. Zhang, B. Wang, L. Cui, Y. Li, J. Qu, Y. Song, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 9097–9100; (h) C. L. Jarvis, M. T. Richers, M. Breugst, K. N. Houk, and D. Seidel, *Org. Lett.*, 2014, **16**, 3556–3559; (i) B.-Feng and B. W. X. Li, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 9206–9209; (j) R. A. Unhale, N. Molleti, N. K. Rana, S. D. S. Bhandary and V. K. Singh, *Tetrahedron Lett.*, 2017, **58**, 145–151.
- 23 S. De Flora, A. Izzotti, F. D’Agostini and C. F. Cesarone, *Am. J. Med.*, 1991, **91**, S122–S130, DOI:10.1016/0002-9343(91)90295-9.

5. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, foi possível descrever pela primeira vez a síntese de *N,S*-acetais empregando enzimas como biocatalisadores de maneira eficiente, de baixo custo e ambientalmente adequada. As reações envolvendo a adição de 1,2-tióis a sulfinamidas para a obtenção de *N,S*-acetais envolveram o estudo entre diferentes enzimas livres tais como, a Lipase, a Quimosina e Albumina.

As diferentes enzimas empregadas durante o estudo dessa reação, forneceram produtos com bons rendimentos e também foi compatível com os diferentes substituintes ligados a porção aromática dos tíois, bem como das sulfinamidas. Existem pontos de distinção que tornam este procedimento uma alternativa útil aos métodos existentes para a síntese de *N,S*-acetais, tais como: tempo reacional curto, temperatura ambiente e bons rendimentos.

Além disso, foi desenvolvida uma estratégia sintética, utilizando a química em fluxo contínuo, para a obtenção de *N,S*-acetais usando LPP imobilizada em $MgCl_2$. Este método foi tolerante a muitos grupos (doadores e retiradores); as reações foram realizadas em um curto tempo de reação; e foi possível a reutilização da enzima por até cinco ciclos. Outra conquista obtida neste estudo foram os dados de avaliação para os produtos *N,S*-acetais como propriedades antioxidantes e antitumorais de células de melanoma (SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 e B16F10-Nex2). Os compostos mostraram que ambas as propriedades antioxidantes e antitumorais estão fortemente associadas aos pares de elétrons do enxofre, e os grupos doadores ligados ao grupo fenil podem aumentar a atividade antioxidante e antitumoral dos compostos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zadonai, D. P.; Saqueto, K. C.; Abreu, S. C. S. R.; Lopes, A. O.; Zuin, V. G. *Rev. Virtual Qui.* **2013**, 6, 73-84.
2. Correa, A. G.; Zuin, V. G. *Química Verde: Fundamentos e aplicações*. 1. ed. São Carlos: Edufscar, **2009**. v. 1. 172p.
3. Ferreira, V. F.; Rocha, D. R.; Silva, F. C. *Rev. Virtual Qui.* **2013**, 6, 85-111.
4. Kaslauskas, R.; Tao, J. *Biocatalysis for green chemistry and chemical process development*. New York: John Wiley, **2011**. 479 p.
5. Grunwald, Peter. *Biochemical fundamentals and applications*. London: Imperial College Press, **2009**. 1035 p.
6. Warner, J. C.; Cannon, A. S.; Dye, K. M. *Environ. Impact Assess. Rev.* **2004**, 24, 775-799.
7. LaPorte, T. L.; Hamedi, M.; DePue, J. S.; Shen, L.; Watson, D.; Hsieh, D. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12, 956-966.
8. Ley, S. V.; Fitzpatrick, D. E.; Myers, R. M.; Battilocchio, C.; Ingham, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 10122-10136.
9. Cao, C.; Fukae, T.; Yamamoto, T.; Kanamaru, S.; Matsuda, T. *Biochem. Eng. J.* **2013**, 76, 13-16.
10. Miletic, N.; Vulkovic, Z.; Nastasovic, A.; Loos, K. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2009**, 56, 196-201.
11. Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry*. 5. ed. Berlin: Springer, **2004**.
12. Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1585-1605.
13. Planchestainer, M.; Contente, M. L.; Cassidy, J.; Molinari, F.; Tamborini, L.; Paradisi, F. *Green Chem.* **2017**, 19, 372-375.
14. Xie, B-H.; Li, W.; Liu, Y.; Li, H-H.; Guan, Z.; He, Y-H. *Tetrahedron* **2012**, 68, 3160-3164.
15. Rizzo, P. V. S.; Boarin, L. A.; Freitas, I. O. M.; Gomes, R. S.; Beatriz, A.; Rinaldi, A. W.; Domingues, N. L. C. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 430-434.
16. Xue, J-W; Song, J.; Manion, I. C. K.; He, Y-H.; Guan, Z. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2016**, 124, 62-69.
17. Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. *Quim. Nova* **2010**, 33, 667-679, 2010.
18. Oliveira, A. R.; Silva, C. D. G.; Katla, R.; Rocha, M. P. R.; Albuquerque, T. B.; Kupfer, V. L.; Rinaldi, A. W.; Domingues, N. L. C. *ChemistrySelect* **2017**, 2, 4462-4465.
19. Albuquerque, T. B.; Silva, C. D. G.; Oliveira, A. R.; Santos, B. F.; Silva, B. A. L.; Katla, R.; Rocha, M. P. D.; Domingues, N. L. C. *New J. Chem.* **2018**, 42, 1642-1645.
20. Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Omoriat, A. T.; Assis, L. F.; Porto, A. L. M. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2004**, 29, 55-61.
21. Schimdt, A.; Dordick, J. D.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, 409, 258-268.
22. Alcade, M.; Ferrer, M.; Plou, F. J.; Ballesteros, A. *Trends in Biotechnol.* **2006**, 6, 281-287.
23. Feng, X-W.; Li, C.; Wang, N.; Li, K.; Zhang, W-W.; Wang, Z.; Yu, X-Q. *Green Chem.* **2009**, 11, 1933-1936.
24. Nidetzky, B.; Schwab, H. *J. Biotechnol.* **2007**, 129, 1-2.
25. Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 157-159.
26. Poliakov, M.; Anastas, P. *Nature* **2001**, 413, 257.
27. Prado, A. G. S. *Quim. Nova* **2003**, 26, 738-744.
28. Shaw, N. M.; Robins, K. T.; Kiener, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 4, 425-435.
29. Hudlicky, T.; Reed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3117-3132.
30. Sangeetha, R.; Arulpandi, I.; Geetha, A. *Res. J. Microbiol.* **2011**, 6, 1-24.
31. Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U. *Green chemistry and catalysis*. Germany: Wiley-VCH, 2007.

32. Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C.; Silveira, C. C. *Quim. Nova* **2003**, 26, 123-129.
33. Farias, L. A.; Fávoro, D. I. T. *Quim. Nova* **2011**, 34, 1089-1093.
34. Clark, J. H. *Handbook of Green Chemistry and Technology*. Oxford: Blackwell Science Osney, **2009**.
35. Zandonai, D. P.; Saqueto, K. C.; Abreu, S. C. S. R.; Lopes, A. P.; Zuin, V. G. *Rev. Virtual Quim.* **2013**, 6, 73-84.
36. Pasques, F. W.; Macedo, G. A. *Quim. Nova* **2006**, 29, 1, 93-99.
37. Meyer, H-P; Eichhorn, E.; Hanlon, S.; Lütz, S.; Schürmann, M.; Wohlgemuth, R.; Coppolecchia, R. *Catal. Sci. Technol.* **2013**, 3, 29-40.
38. Said, S.; Pietro, C.L.R. Ribeirão Preto: Legis Summa, **2004**, 412.
39. Cabral, J. M. S.; Barros, M. R. A.; Pinheiro, H.; Prazeres, D. M. *J. Biotechnol.* **1997**, 59, 133-143.
40. Messias, J. M.; Da Costa, B. Z.; Lima, V. M. G.; Dekker, R. F. H.; Rezende, M. I.; Krieger, N.; Barbosa, A. M. *Enzyme and Microb. Technol.* **2009**, 45, 426-431.
41. Sayali, K.; Sadicha, P.; Surekha, S. *Int. J. Curr. Microbiol Appl. Sci.* **2013**, 2, 135-146.
42. David, L. N.; Michael, M. C. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, **2000**.
43. Das, D.; Das, P. K. *Langmuir* **2003**, 19, 22, 9114-9119.
44. Sintra, T. E.; Ventura, S. P.M.; Coutinho, J. A. P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, 107, 140-151.
45. Sonkaria, S.; Boucher, G.; Florez-Alvarez, J.; Said, B.; Hussain, S.; Ostler, E. L.; Gui, S.; Thomaz, E. W.; Resmini, M.; Gallacher, G.; Broncklerhurst, K. *Biochem. J.* **2004**, 381, 125-130.
46. More, G. V.; Badgujar, K. C.; Bhanage, B. M. *RSC Adv.* **2015**, 5, 4592-4598.
47. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger princípios de bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Sarvier, **2006**.
48. Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N. *Quim. Nova* **1999**, 22, 863-873.
49. Koshland, D. E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 33, 2375-2378.
50. Paiva, A. L.; Balcão, V. M.; Malcata, F. X. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 27, 187-204.
51. Orozco, E. V. M. Promiscuidade enzimática de lipases na síntese de aldóis e 2H-cromenonas. 2019. 268 f. Tese de Doutorado-UFSCAR, São Carlos, 2019.
52. Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E.; Miller, R. *Science* **2009**, 1, 237-250.
53. Falus, P.; Boros, Z.; Kovács, P.; Poppe, L.; Nagy, J. *J. Flow Chem.* **2014**, 4, 125-134.
54. Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T. *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, 53, 315-351.
55. Brem, J.; Pilbak, S.; Paizs, C.; Banoczi, G.; Irimie, F. D.; Tosa, M. I.; Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 22, 916-923.
56. Gupta, R.; Kumari, A.; Syal, P.; Singh, Y. *Prog. Lipid Res.* **2015**, 57, 40-54.
57. Fojan, P.; Jonson, P. H.; Petersen, M. T. N. *Biochimie* **2000**, 82, 1033-1041.
58. Akoh, C. C.; Chang, S. W.; Lee, G. C.; Shaw, J. F. *Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 8995-9005.
59. Palomo, J. M.; Segura, R. L.; Mateo, C.; Terreni, M.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, 16, 869-874.
60. Chaubey, A.; Parshad, R.; Gupta, P.; Taneja, S. C.; Qazi, G. N.; Rajan, C. R.; Ponrathnam, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 7, 29-34.
61. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Socool, V. T. *Appl. Bioch. Biotech.* **1999**, 29, 119-131.
62. Hasan, F.; Shah, A.; Hameed, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 235-251.
63. Gupta, R.; Beg, Q. K.; Lorenz, P. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2002**, 59, 15-32.
64. Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2010**, 64, 1-22.

65. Almeida, R. V.; Alqueres, S. M. C.; Larentis, A. L.; Rossle, S. C.; Cardoso, A. M.; Almeida, W. I.; Bisch, P. M.; Alves, T. L. M.; Martins, O. B. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 1128-1136.
66. Chitpinityol, S.; Crabbe, M. J. C. *Food Chem.* **1998**, 61, 395-418.
67. Turhan, M.; Mutlu, M. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, 22, 342-347.
68. Araújo, J. A. Produção De Quimosina B De Bos Taurus Em Pichia Pastoris. 2008. 135 F. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade De Brasília, Brasília, 2008.
69. Mohanty, A. K.; Mukhopadhyay, U. K.; Kaushik, J. K.; Grover, S.; Batish, V. K. *J. Dairy Sci.* **2003**, 70, 37-43.
70. Johnson, M. E.; Lucey, J. A. *J. Dairy Sci.* **2006**, 89, 1174-1178.
71. Lima, A. C. S. Síntese De Derivados de β -Aminocetônicos via Reação de Mannich Utilizando Biocatalisadores. 2012. 98 F. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-UFGD, Dourados, 2012.
72. Gelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, 1594, 84-99.
73. Bourassa, P.; Hasni, I.; Tajmir-Riahi, H. A. *Food Chem.* **2001**, 129, 3, 1148-55.
74. Dalla-Vechia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. *Quim. Nova* **2004**, 27, 623-630.
75. Fernandes, K. F.; Lima, C. S.; Lopes, F. M. *Revista Processos Químicos* **2010**, 4, 53-58.
76. Verma, M. L.; Barrow, C. J.; Puri, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 23-39.
77. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C.; Castro, H. F.; Giordano, R. L. C. *Quim. Nova* **2011**, 34, 831-840.
78. Lopez-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *J. Biotechnol.* **2005**, 116, 1-10.
79. Freitas, L.; Perez, V. H.; Santos, J. C.; De Castro, H. F. *Braz. J. Chem. Soc.* **2007**, 18, 1360-1366.
80. Cao, L. Carrier-Bound Immobilized Enzymes, Principles, Applications And Design. The Netherlands, P. 531, **2005**.
81. Kharrat, N.; Ali, Y. B.; Marzouk, S.; Gargouri, Y.-T.; Chaabouni, M. *Process. Biochem.* **2011**, 46, 1083-1089.
82. Barbosa, A. S.; Silva, M. A. O.; Carvalho, N. B.; Mattedi, S.; Iglesias, M. A.; Fricks, A. T.; Lima, A. S.; Franceschi, E.; Soares, C. M. F. *Quim. Nova* **2014**, 37, 969-976.
83. Simões, A. S.; Mori, R. Y.; Faria, R.; Castro, H. F. *Quim. Nova* **2011**, 34, 33-38, 2011.
84. Nelson, J. M.; Griffin, E. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, 38, 1109-1115.
85. Guisan J. M. Immobilization Of Enzymes And Cells. Humana Press: Towata, Cap. 1. **2006**.
86. Chen, Y.; Kang, E. T.; Neoh, K. G.; Tan, K. L. *Eur. Polym. J.* **2000**, 36, 2095-2103.
87. MacArio, A.; Giordano, G.; Setti, L.; Parise, A.; Campelo, J. M.; Marinas, J. M.; Luna, D. *Biocatal. Biotransform.* **2007**, 25, 328-335.
88. Sheldon, R. A.; Pelt, S. V. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 6223-6235.
89. Zhang, B.; Weng, Y.; Xu, H.; Mao, Z. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93, 61-70.
90. Majewski, M. B.; Howarth, A. J.; Li, P.; Wasielewski, M. R.; Huppab, J T.; Farha, O. K. *Crystengcomm.* **2017**, 19, 4082-4091.
91. Feng, D.; Liu, T. F.; Su, J.; Bosch, M.; Wei, Z.; Wan, W.; Lian, X. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 1-8.
92. Ang, Y.; Caruso, F. *Chemistry Of Materials* **2005**, 17, 953-961.
93. Wang, P.; Daí, S.; Waezsada, S. D.; Tsao, A. Y.; Davison, B. H. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 74, 249-255.
94. Cardoso, C. L.; Moraes, M. C.; Cass, Q. B. *Quim. Nova*, **2009**, 32, 175-187.
95. Gao, S.; Wang, Y.; Diao, X.; Luo, G.; Dai, Y. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 3830-3837.
96. Kannan, K.; Jasra, R. V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, 56, 34-40.
97. Trojanowicz, M. *Molecules* **2020**, 25, 1434-2406.

98. Machado, A. H. L.; Pandoli, O.; Miranda, L. S. M.; De Souza, R. O. M. A. *Rev. Virtual Quim.* **2014**, 6, 1076-1085.
99. Wu, S.-W.; Liu, J.-L.; Liu, F. *Org. Lett.* **2016**, 18, 1-3.
100. Britton, J.; Raston, C. L. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 1250-1271.
101. Baumann, M.; Baxendale, I. R. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, 11, 1194-1219.
102. Souza, R. O. M. A.; Miranda, L. S. M. *Rev. Virtual Quim.* **2014**, 6, 34-43.
103. Moreira, B. C. S.; Takeuchi, R. M.; Richter, E. M.; Santos, A. L. *Quim. Nova* **2014**, 37, 1566.
104. Geyer, K.; Codée, J. D. C.; Seeberger, P. H. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8434-8442.
105. Plutschack, M. B.; Pieber, B.; Gilmore, K.; Seeberger, P. H. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 11796-11893.
106. Asprión, N.; Mollner, S.; Poth, N.; Rumpf, B. Energy Management in Chemical Industry. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, **2000**.
107. Razzaq, T.; Kappe, C. O. *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 1274-1289.
108. Sahoo, H. R.; Kralj, J. G.; Jensen, K. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5704-5708.
109. Adamo, A.; Beingessner, R. L.; Behnam, M.; Chen, J.; Jamison, T. F.; Jensen, K. F.; Monbaliu, J.-C. M.; Myerson, A. S.; Revalor, E. M.; Snead, D. R.; Stelzer, T.; Weeranoppanant, N.; Wong, S. Y.; Zhang, P. *Science* **2016**, 352, 61-67.
110. CHEMISTRY WORLD. The flow revolution. **2017**. Disponível em: <<https://www.chemistryworld.com/features/the-flow-revolution/2500496.article>>. Acesso em: 10 ago. 2020.
111. Cole, K. P.; Groh, J. M.; Johnson, M. D.; Burcham, C. L.; Campbell, B. M.; Diseroad, W. D.; Heller, M. R.; Howell, J. R.; Kallman, N. J.; Koenig, T. M.; May, S. A.; Miller, R. D.; Mitchell, D.; Myers, D. P.; Myers, S. S.; Phillips, J. L.; Polster, C. S.; White, T. D.; Cashman, J.; Hurley, D.; Moylan, R.; Sheehan, P.; Spencer, R. D.; Desmond, K.; Desmond, P.; Gowran, O. *Science* **2017**, 356, 1144-1150.
112. Anastas, P.; Eghbali, N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312.
113. Lummiss, J. A. M.; Morse, P. D.; Beingessner, R. L.; Jamison, T. F. *Chem. Rec.* **2017**, 17, 667-680.
114. Cai, Y.; Ge, H.; Sun, W.; Miao, Z. *Synthesis* **2015**, 47, 1669-1677.
115. Unhale, R. A.; Molleti, N.; Rana, N. K.; Singh, V. K. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 145-151.
116. Ingle, C. K.; Mormino, M. G.; Wojtas, L.; Antilla, J. C. *Org. Lett.* **2011**, 13, 4822-4825.
117. Wang, H.-Y.; Zhang, J.-X.; Cao, D.-D.; Zhao, G. *ACS Catal.* **2013**, 3, 2218-2221.
118. Fang, X.; Li, Q.; Tao, H.; Wang, C. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 327-331.

Supporting information

Adição 1,2 tióis catalisada por lipase às iminas sob condições moderadas

Tábata B. Albuquerque, Caren D. G. da Silva, Aline R. de Oliveira, Beatriz F. dos Santos, Beatriz A. L. da Silva, Ramesh Katla, Mariana P. D. Rocha and Nelson L. C. Domingues*

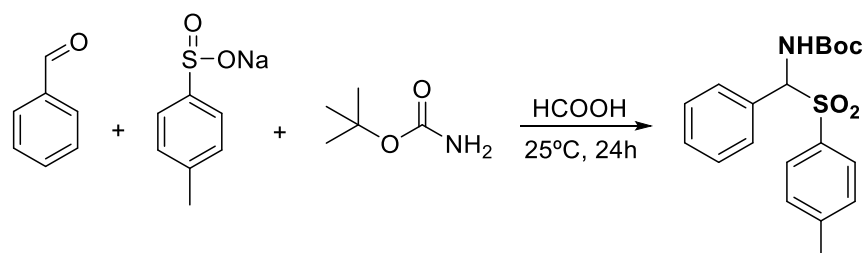
| | |
|---|---|
| 1. PROCEDIMENTO GERAL..... | 1 |
| 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 1 |
| 2.1. Procedimento Geral para a síntese <i>N</i> -Boc-Iminas..... | 2 |
| 2.2. Procedimento Geral para adição de Tióis a <i>N</i> -Boc-Iminas | 2 |
| 3. Análise dos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C | 3 |

1. PROCEDIMENTO GERAL

Todas as reações foram realizadas com reagentes químicos e solventes sem nenhum tratamento específico. As respectivas reações foram monitoradas por Cromatografia de Camada Fina (TLC) MACHEREY-NAGEL (SIL G / UV₂₅₄) e foram visualizados por fluorescência com luz UV a 254 nm. A purificação dos compostos foi realizada por cromatografia em sílica gel (eluentE: hexano/EtOAc, 90:10). Espectros de RMN de ¹H e ¹³C RMN foram realizados em CDCl₃ em um equipamento espectrômetro Bruker (300 MHz and 75 MHz respectivamente). Os dados para RMN ¹H são relatados a seguir: deslocamento químico (δ , ppm), multiplicidade (s = singleto, d = doubleto, q =quarteto, m = multipletto), constante de acoplamento (*J*) e atribuição. Os espectros infravermelhos realizados em um espectrômetro FT/IR 4100 tipo A da marca Jasco.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Procedimento Geral para *N*-Boc-Iminas

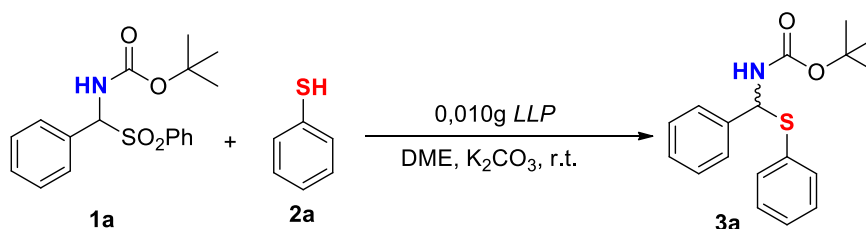


Em um frasco de 50 mL foi adicionado aldeído (5.76 mmol), ácido benzenosulfínico sal de sódio (5.76 mmol), *tert*-butyl carbamato (5.76 mmol) e HCO₂H (217 μL). A mistura foi agitada magneticamente em CH₃OH (5 mL) e água (10 mL) em temperatura ambiente por 24 horas. Depois de completo, o sólido foi filtrado e lavado com éter e seco *overnight*. (Rendimento 95%).¹

Referência da literatura

1 Wang, H. Y, Zhang, J. X, Cao, D. D and Zhao, G. Enantioselective Addition of Thiols to Imines Catalyzed by Thiourea–Quaternary Ammonium Salts. *ACS Catalysis*, **2013** 3 (10), 2218-2221.

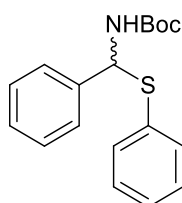
2.2. Procedimento Geral para adição tióis a *N*-Boc-Iminas



Em um frasco de 25 mL foi adicionado tiol (0.2 mmol), imina (0.1 mmol), K₂CO₃ (0.5 mmol) e 0,001g LLP em DME (4 mL) em temperatura ambiente. A reação foi agitada magneticamente e foi monitorada por CCD (eluente: hexano/ EtOAc, 90:10). Quando a reação foi concluída, a enzima foi separada por filtração e a mistura foi extraída com DCM (3x10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas sobre Na₂SO₄ anidro, o sal foi removido por filtração e a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica (eluente: hexano/ EtOAc, 90:10) .

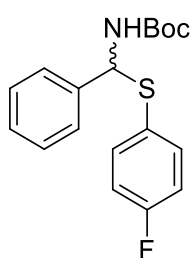
3. Análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

terc-butil (fenil(feniltio)metil)carbamato:



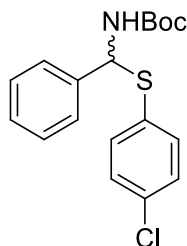
Sólido branco. PM: 315.13 g/mol. $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_2\text{S}$. **IV** (KBr) ($\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$): 3358, 2959, 1689, 1165, 1086, 1021, 876, 825, 798. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.35 (s, 9H), 5.22-5.25 (d, $J=9$ Hz, 1H), 6.32-6.29 (d, $J=9$ Hz, 1H), 7.30-7.52 (m, 10H). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 28.17, 61.21, 126.44, 127.74, 128.01, 128.19, 128.62, 128.90, 132.93, 133.39, 139.02, 139.17, 154.21.

terc-butil (((4-fluorfenil)tio)(fenil)metil)carbamato:



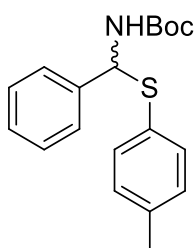
Sólido branco. PM: 333.12 g/mol. $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FNO}_2\text{S}$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$): 3361, 1688, 1510, 1349, 1287, 1168, 1020, 882, 829. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO): δ ppm 1.35 (s, 1H), 5.22-5.25 (d, $J=9$, 1H), 6.29-6.32 (d, $J=9$ Hz, 1H), 7.30-7.52 (m, 9H). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 28.20, 28.92, 61.55, 115.53, 118.58, 128.30, 129.04, 132.75, 133.30, 160.77-164.05 (d, $J_{\text{C-F}}=245.25$).

terc-butil (((4-clorofenil)tio)(fenil)metil)carbamato:



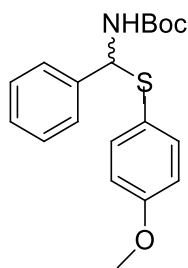
Sólido branco. PM: 349.09 g/mol. $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClNO}_2\text{S}$. **IV** (KBr) ($\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$): 3358, 1682, 1512, 1474, 1387, 1362, 1250, 1165, 1093, 1014, 883. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.35 (s, 1H), 5.22-5.25 (d, $J=9$, 1H), 6.29-6.32 (d, $J=9$ Hz, 1H), 7.30-7.52 (m, 9H). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 28.18, 30.41, 61.73, 122.67, 125.63, 126.94, 127.83, 129.16, 130.07, 130.45, 130.69, 132.42, 135.70, 143.83, 155.06.

tect-butil (fenil(*p*-toliltio)metil)carbamato:



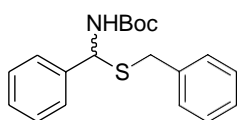
Sólido branco. PM: 329.14 g/mol. $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{S}$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$): 3352, 2966, 1682, 1505, 1250, 1047, 1021, 876, 811. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.34 (s, 9H), 2.26 (s, 3H), 5.09-5.12 (d, $J=9$ Hz, 1H), 6.12-6.15 (d, $J=9$ Hz, 1H), 6.97-7.50 (m, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 21.00, 28.08, 61.46, 126.33, 127.96, 128.39, 128.45, 128.86, 129.01, 129.58, 129.72, 131.37.

terc-butil (((4-metoxifenil)tio)(fenil)metil)carbamato:



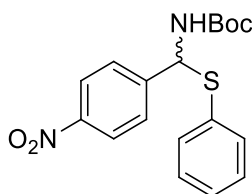
Sólido branco. PM: 345.14 g/mol. C₁₉H₂₃NO₃S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3367, 1681, 1586, 1490, 1362, 1290, 1168, 1026, 875, 826. **¹H RMN** (500 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.36 (s, 9H), 3.82 (s, 3H), 5.23-5.25 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.14-6.16 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.83-7.44 (m, 9H). **¹³C RMN** (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.25, 55.38, 62.25, 114.64, 123.15, 128.07, 128.44, 128.58, 129.02, 129.76, 132.43, 132.68, 134.46, 136.63, 139.27.

terc-butil ((benziltio)(fenil)metil)carbamato:



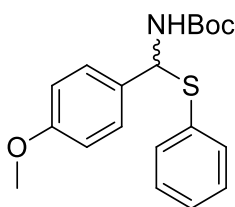
Sólido branco. PM: 345.14 g/mol. C₁₉H₂₃NO₂S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3367, 1681, 1586, 1490, 1362, 1290, 1168, 1026, 875, 826. **¹H RMN** (500 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.38 (s, 9H), 3.70-3.82 (m, 2H), 5.07-5.09 (d, J = 10 Hz), 5.77-5.83 (m, 1H), 6.87-7.29 (m, 10H). **¹³C RMN** (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.24, 29.36, 58.62, 126.39, 127.00, 127.12, 127.43, 128.07, 128.36, 128.49, 128.90, 128.98, 129.42, 129.74, 139.51.

terc-butil ((4-nitrofenil)(feniltio)metil)carbamato:



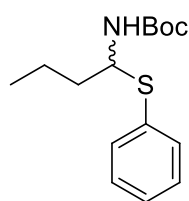
Sólido branco. PM: 360.11 g/mol. C₁₈H₂₀N₂O₄S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3358, 2959, 1682, 1512, 1362, 1263, 1171, 1093, 1014, 883, 825. **¹H RMN** (500 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.27 (s, 9H), 5.10-5.12 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.17-6.19 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.14-7.34 (m, 9H). **¹³C RMN** (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.18, 28.24, 29.71, 61.66, 126.47, 128.39, 128.75, 129.08, 129.18, 129.76, 130.79, 131.46, 134.48, 134.92, 138.73.

terc-butil ((4-metoxifenil)(feniltio)metil)carbamato:



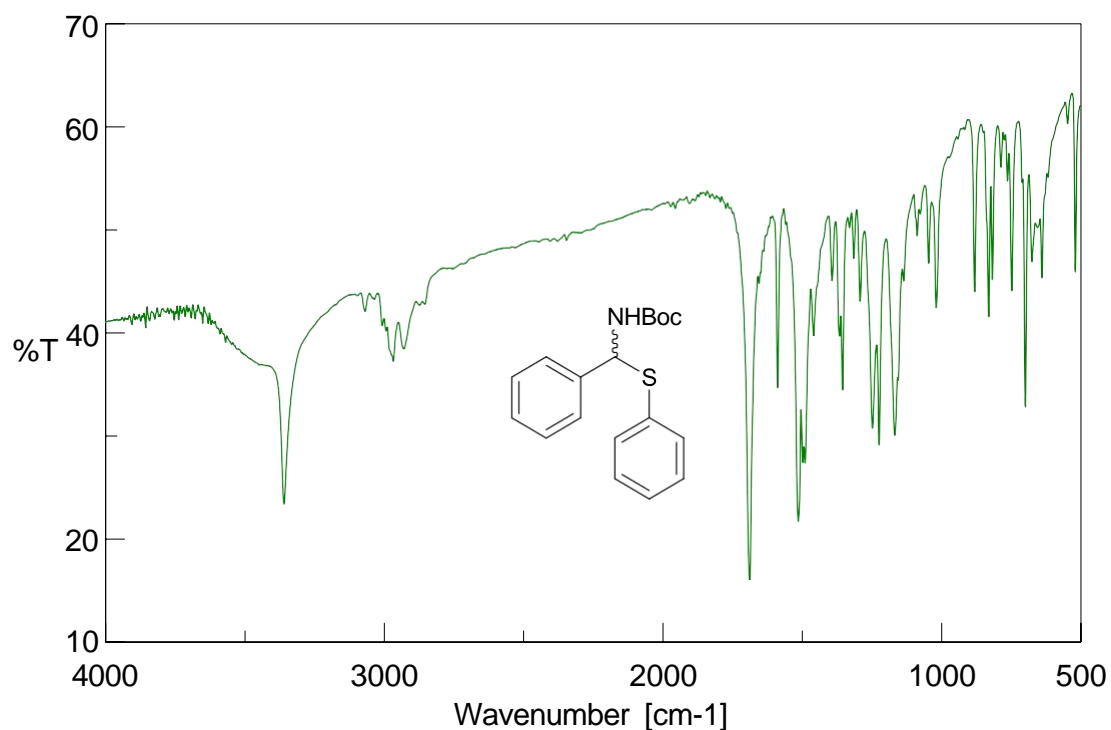
Sólido Branco. PM: 345.14 g/mol. C₁₉H₂₃NO₃S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3352, 2966, 1689, 1617, 1505, 1250, 1165, 1014, 883, 837. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ ppm, 1.33 (s, 9H), 3.81 (s, 3H), 5.16-5.19 (d, J = 9 Hz, 1H), 6.23-6.26 (d, J = 9 Hz, 1H), 6.87-7.49 (m, 9H). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.22, 55.35, 59.48, 111.76, 113.99, 126.73, 127.71, 128.97, 129.41, 130.22, 131.76, 132.63, 143.26, 159.31.

***tert*-butil (1-(feniltio)butil)carbamato:**



Sólido branco. PM: 281.41 g/mol. $C_{15}H_{23}NO_2S$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$): 3367, 1681, 1586, 1490, 1362, 1290, 1168, 1026, 875, 826. $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ ppm 0.92-0.95 (m, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.46-1.52 (m, 2H), 1.63-1.75 (m, 2H), 4.67-4.65 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 5.12-5.17 (dd, $J = 10$ Hz, 1H), 7.26-7.47 (m, 5H). $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ ppm 13.54, 19.55, 28.24, 29.70, 38.35, 58.80, 127.60, 128.83, 129.06, 132.84, 133.45, 154.56.

Figura 1. FTIR espectro para *tert*-butil (fenil(feniltio)metil)carbamato.



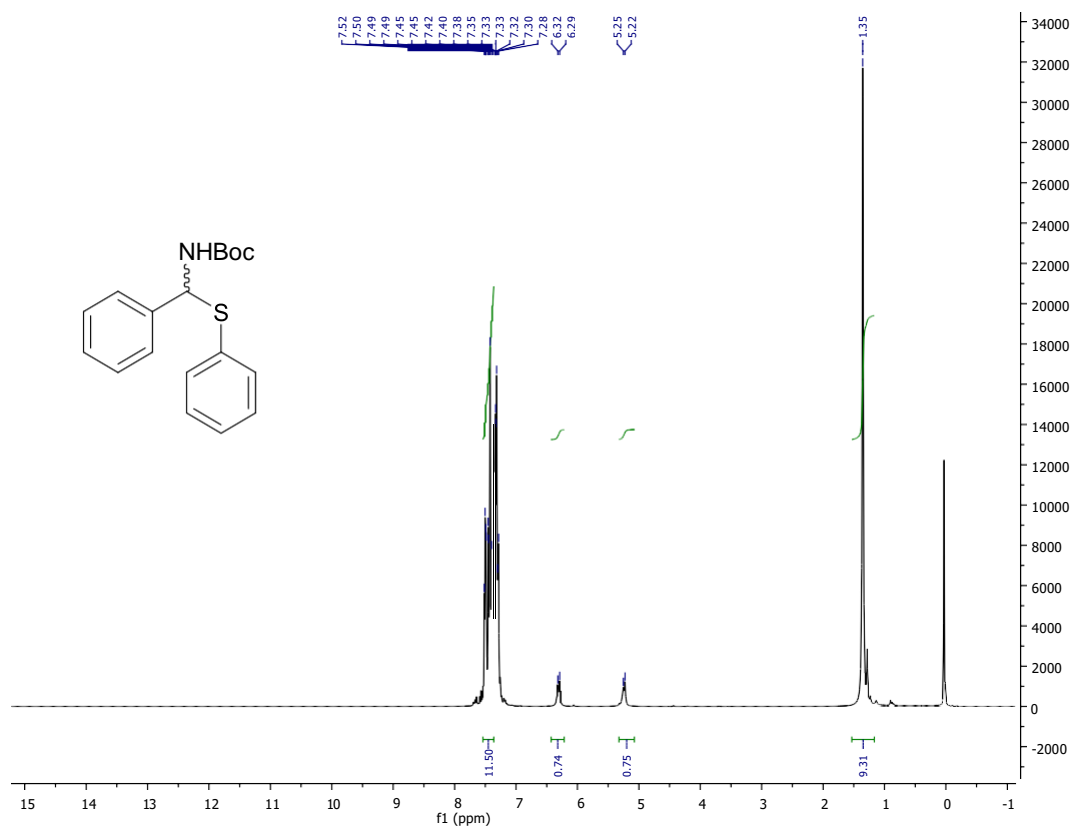


Figura 2. Espectro de RMN ^1H para o composto *tert*-butil (fenil(feniltio)etil)carbamato.

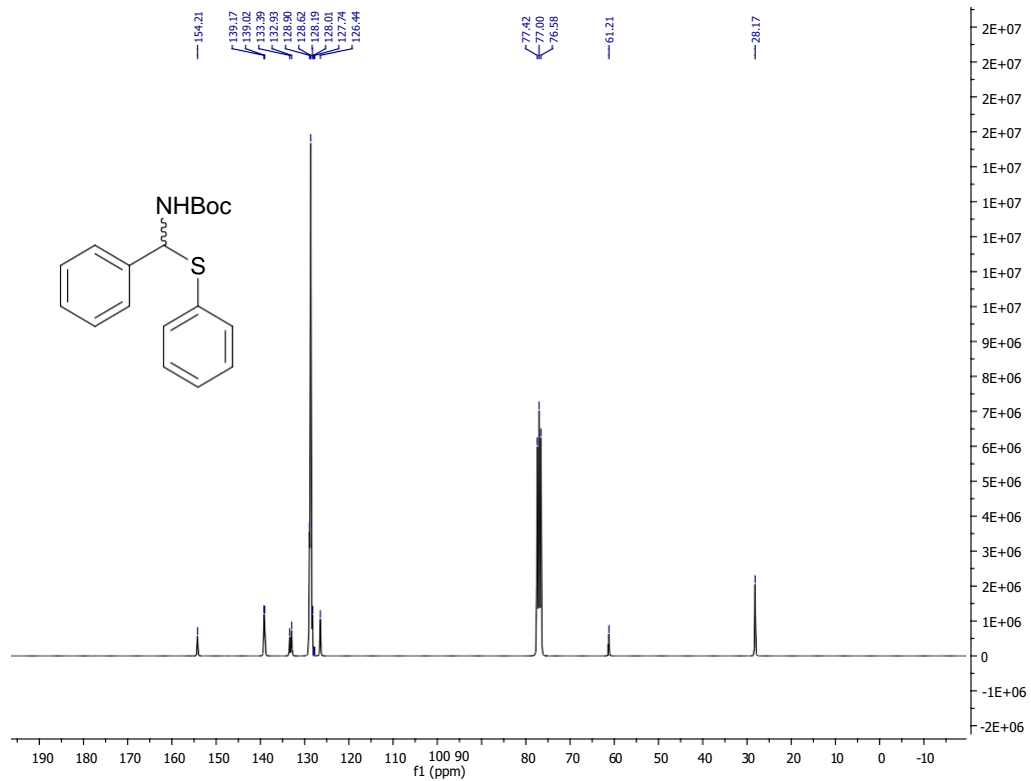


Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (fenil(feniltio)etil)carbamato.

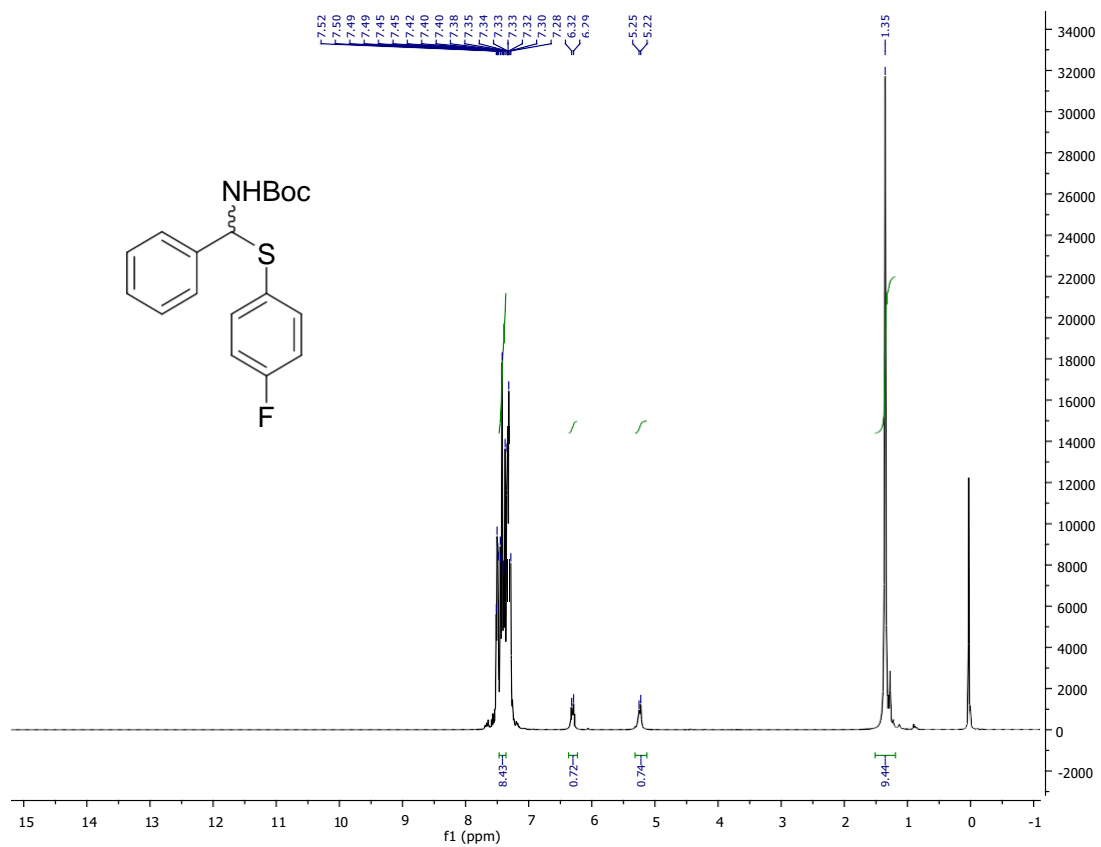


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H RMN para o composto *tert*-butil (((4-fluorfenil)tio(fenil)metil)carbamato.

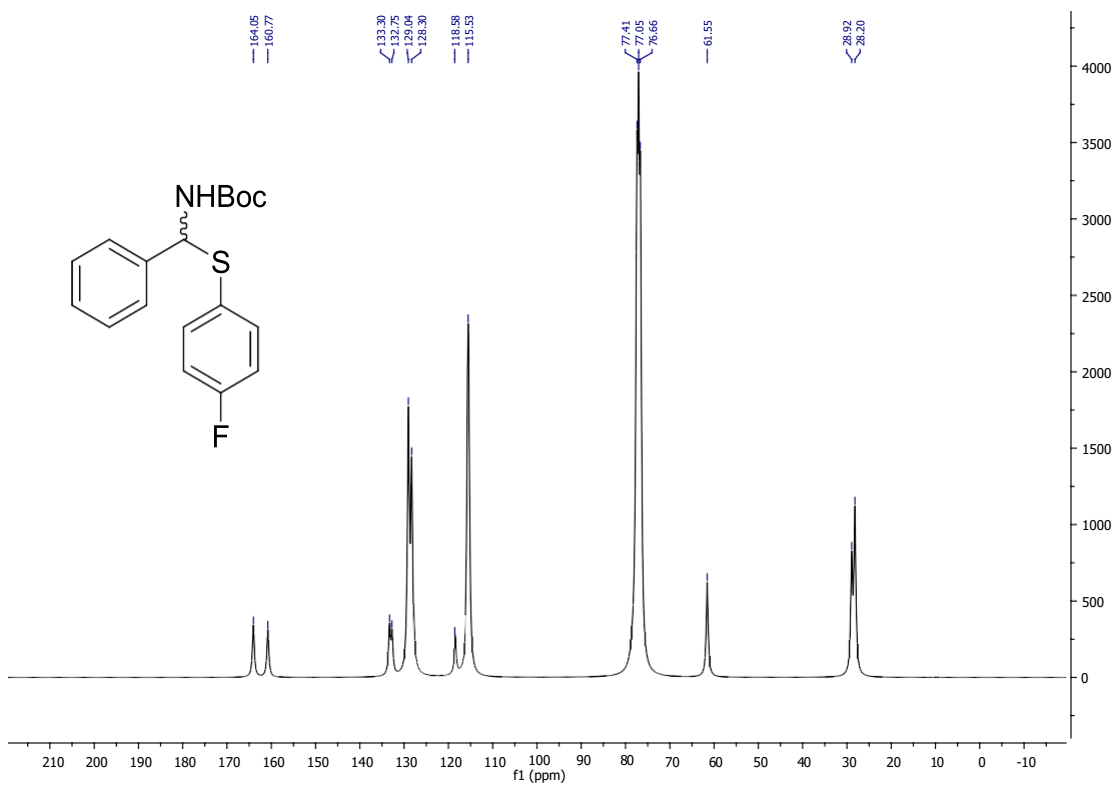


Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (((4-fluorfenil)tio(fenil)metil)carbamato.

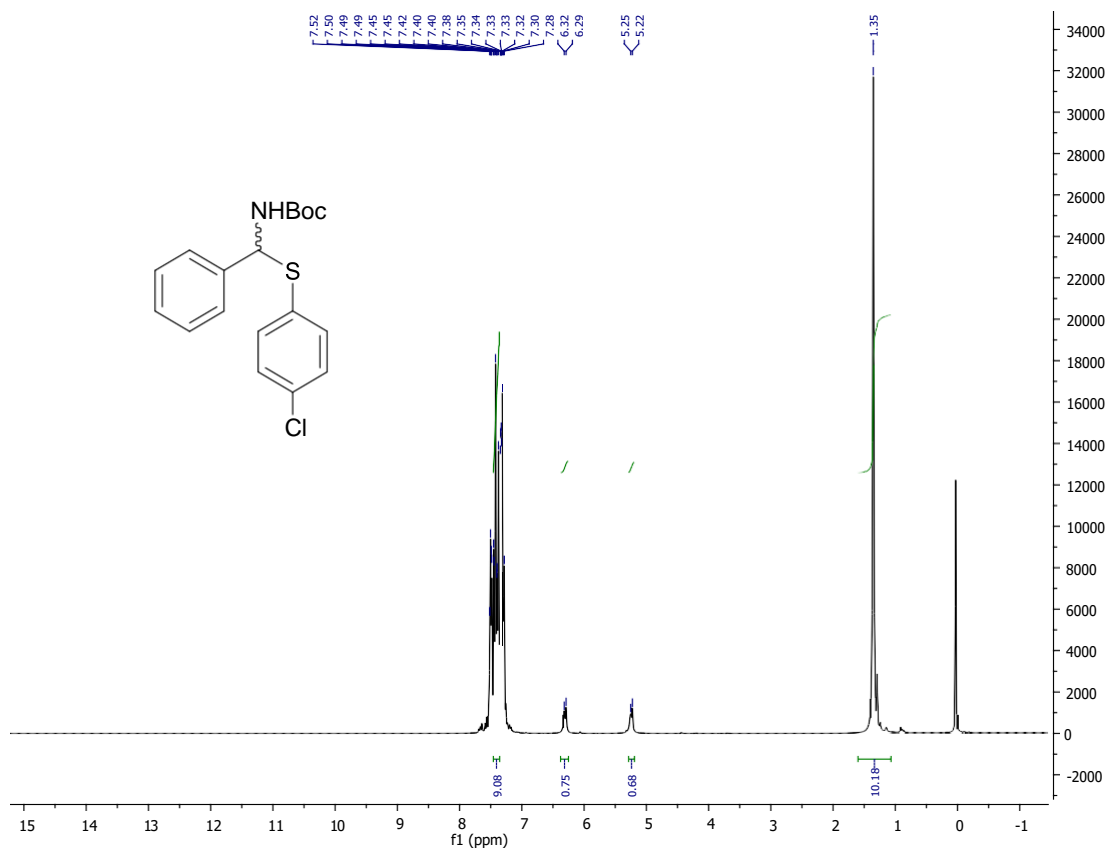


Figura 6. Espectro de RMN de ¹H para o composto *tert*-butil (((4-clorofenil)tio)fenil)metil)carbamato.

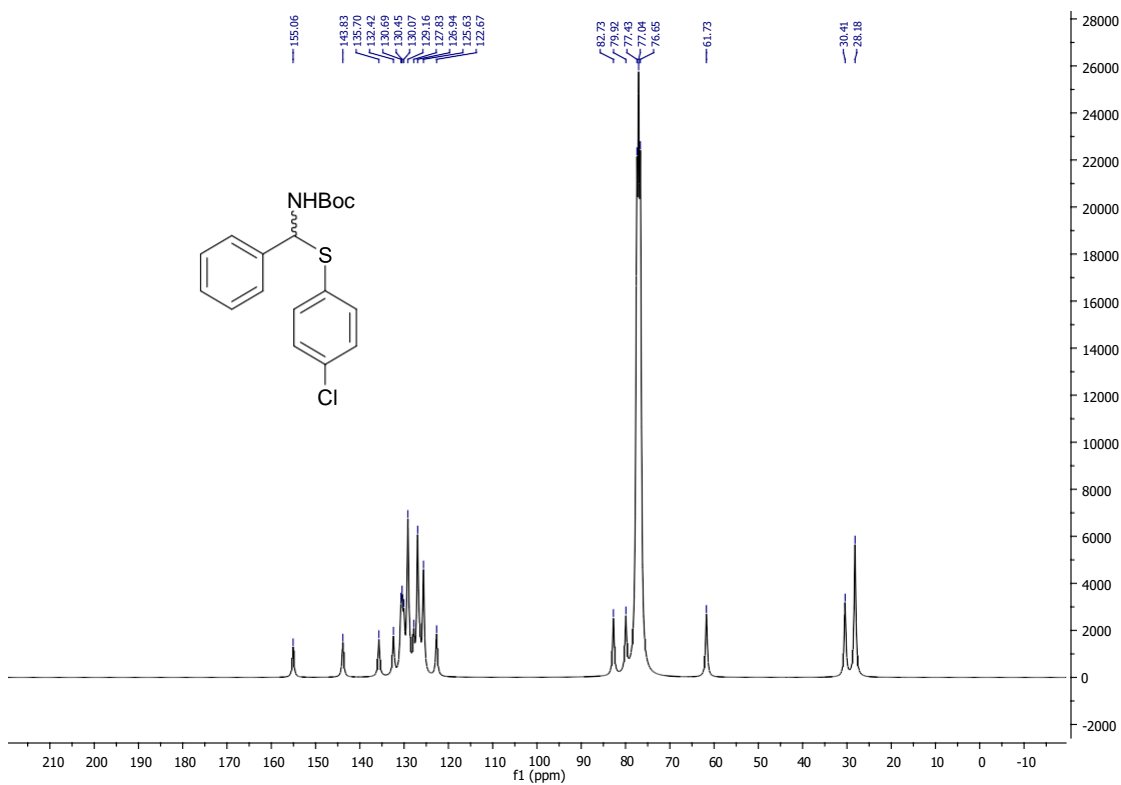


Figura 7. Espectro de RMN de ¹³C para o composto *tert*-butil (((4-clorofenil)tio)fenil)metil)carbamato.

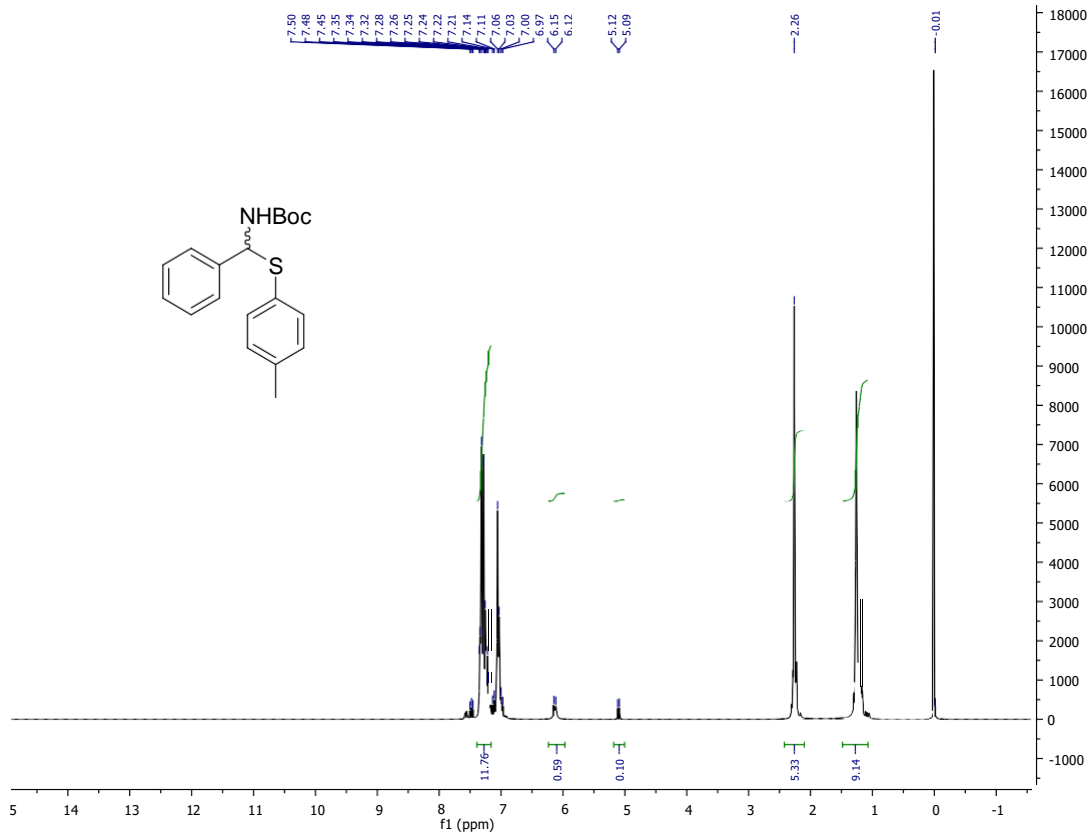


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil (fenil)(*p*-toliltio)metil)carbamato.

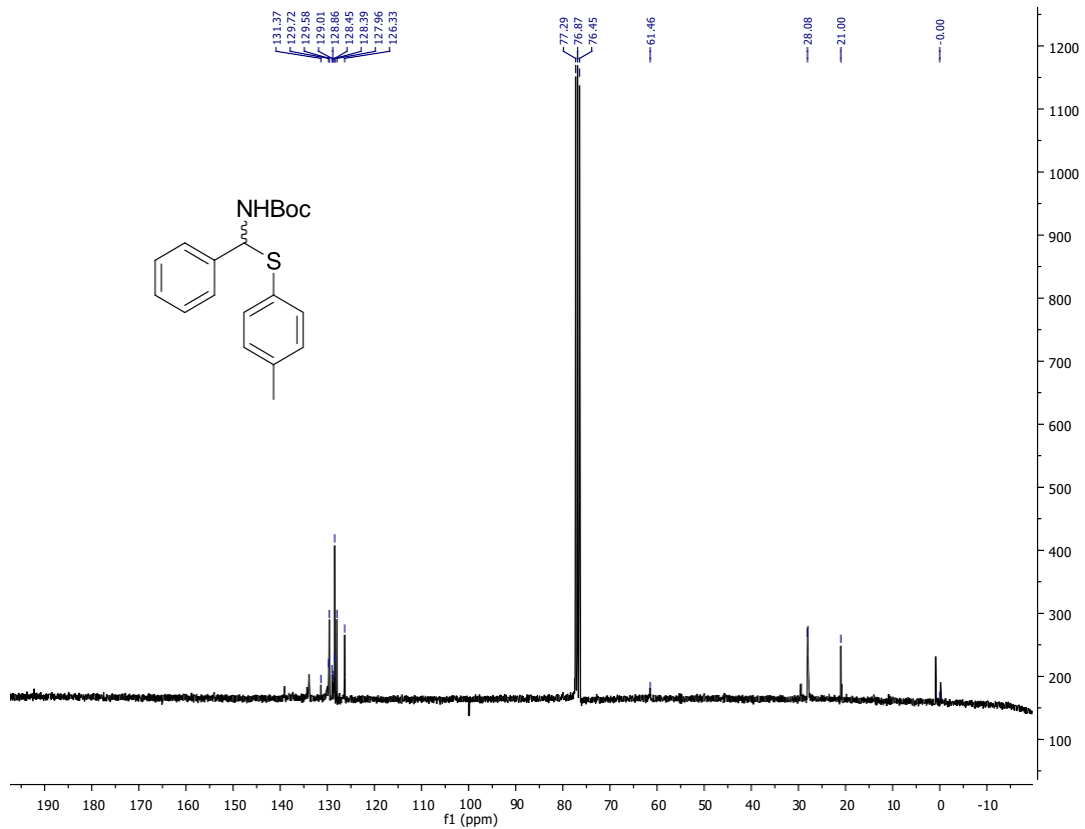


Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C para o compost *tert*-butil (fenil)(*p*-toliltio)metil)carbamato.

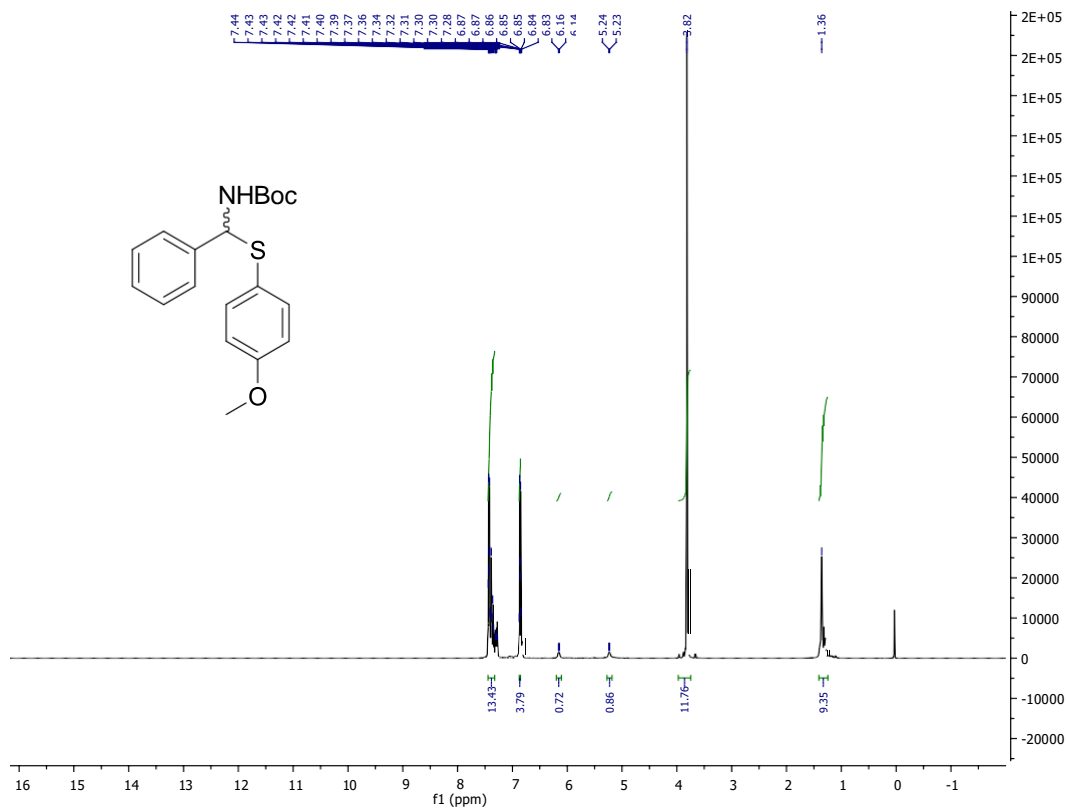


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil (((4-metoxifenil)tio)(fenil)metil)carbamato.

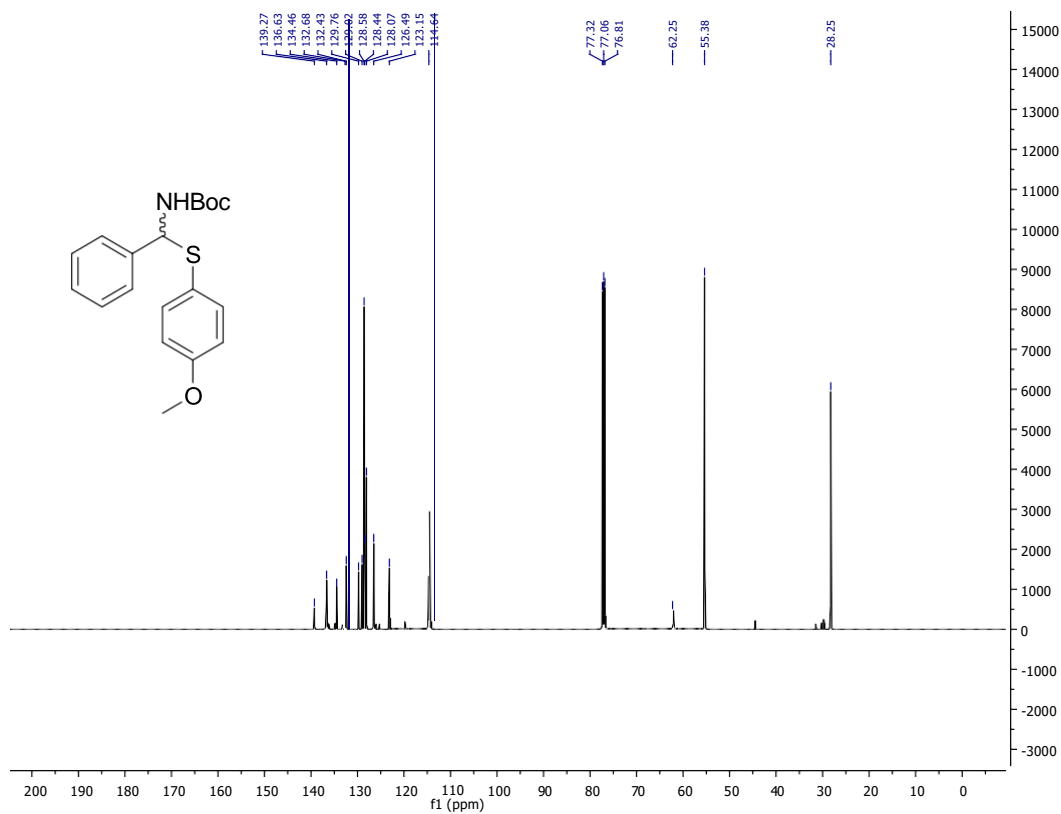


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (((4-metoxifenil)tio)(fenil)metil)carbamato.

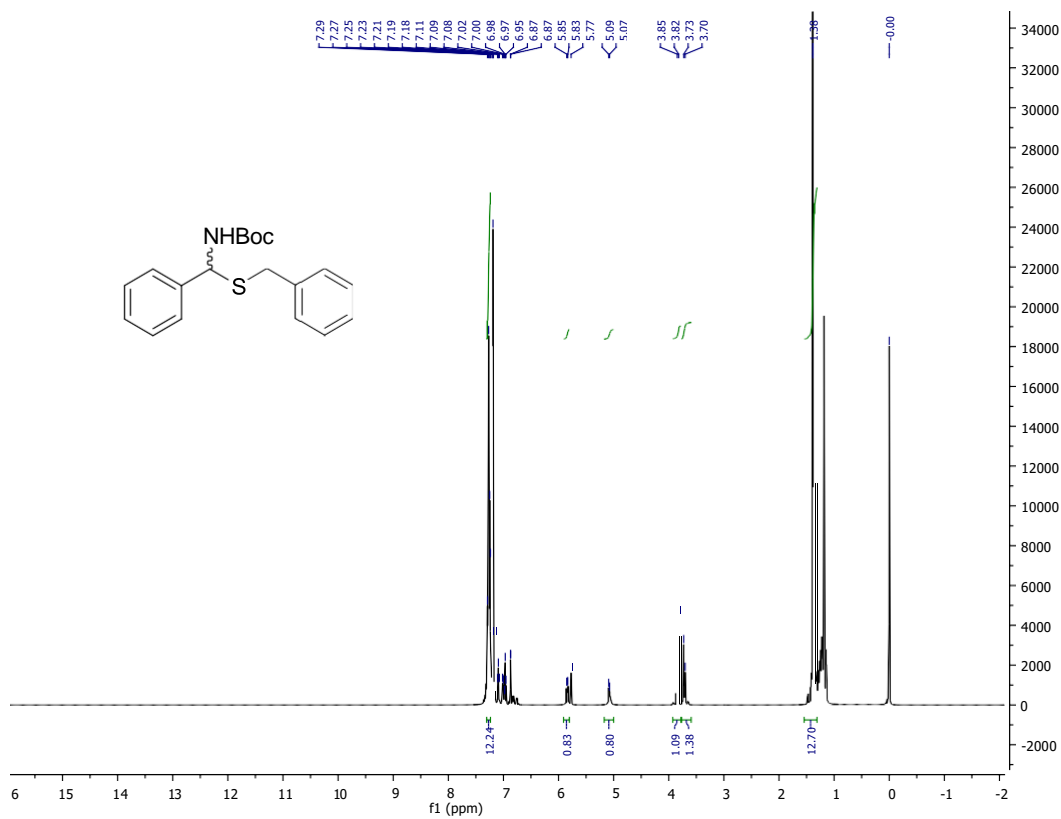


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((benziltio)(fenil)metil)carbamato.

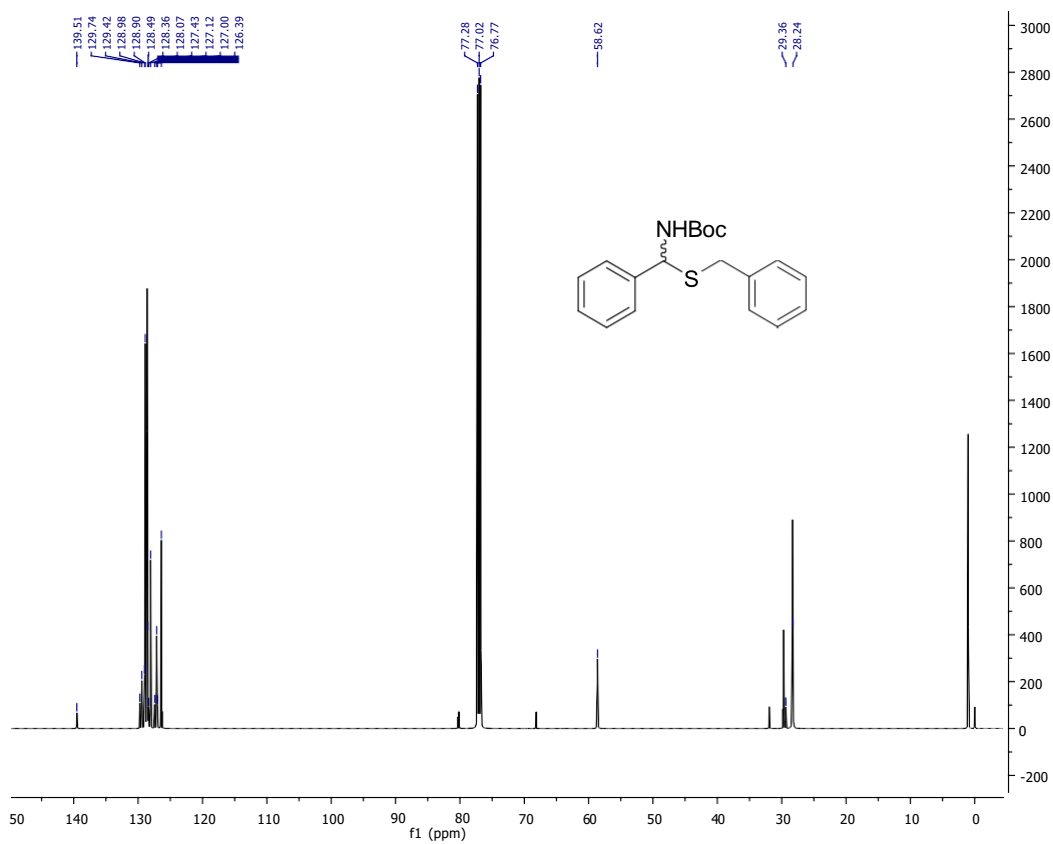


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((benziltio)(fenil)metil)carbamato.

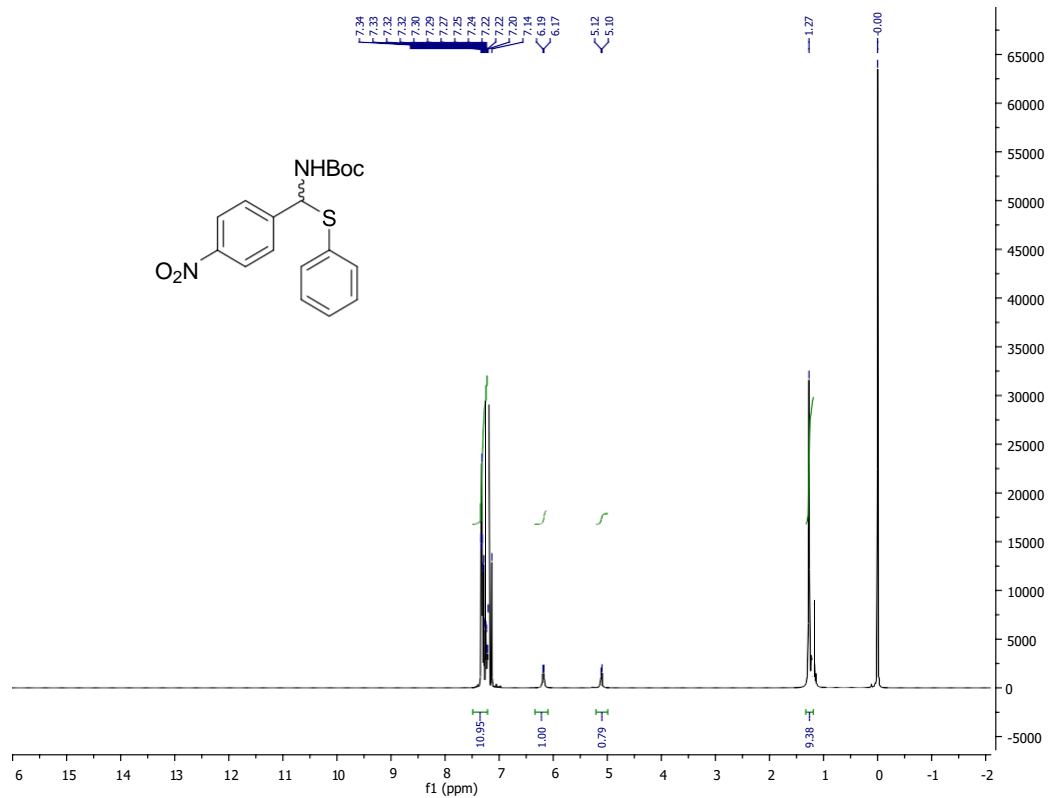


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((4-nitrofenil)(fenil)metil)carbamato.

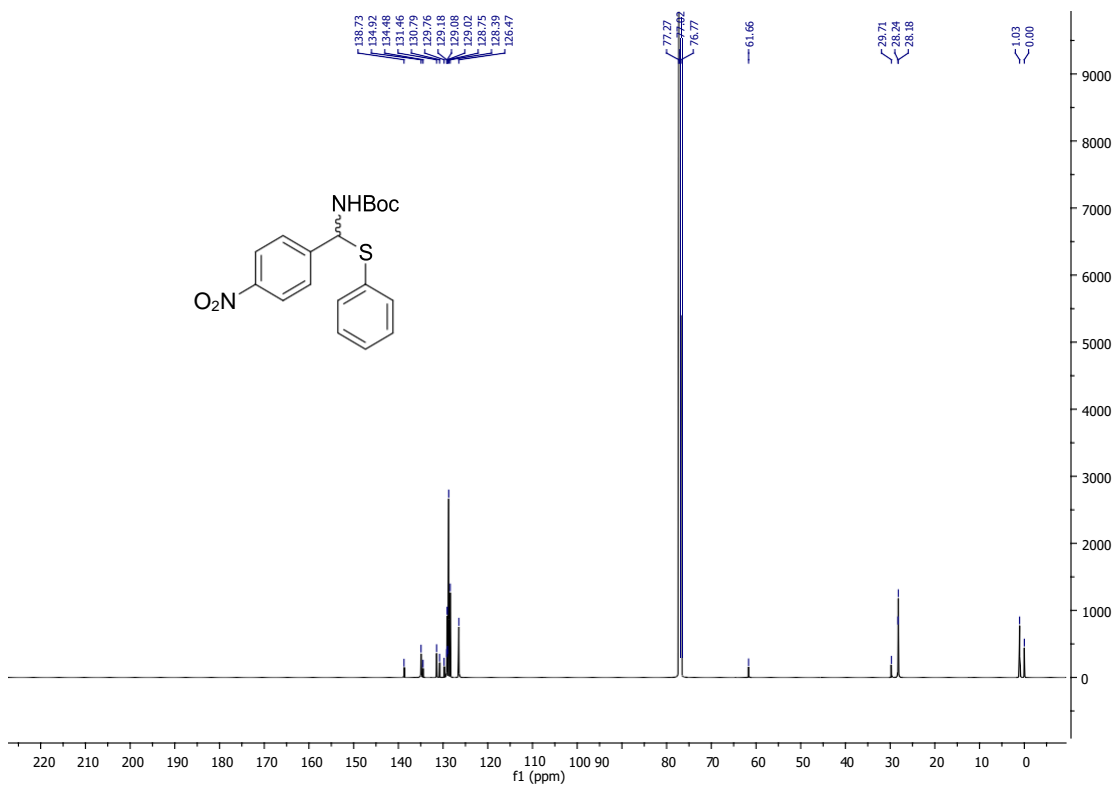


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((4-nitrofenil)(fenil)metil)carbamato.

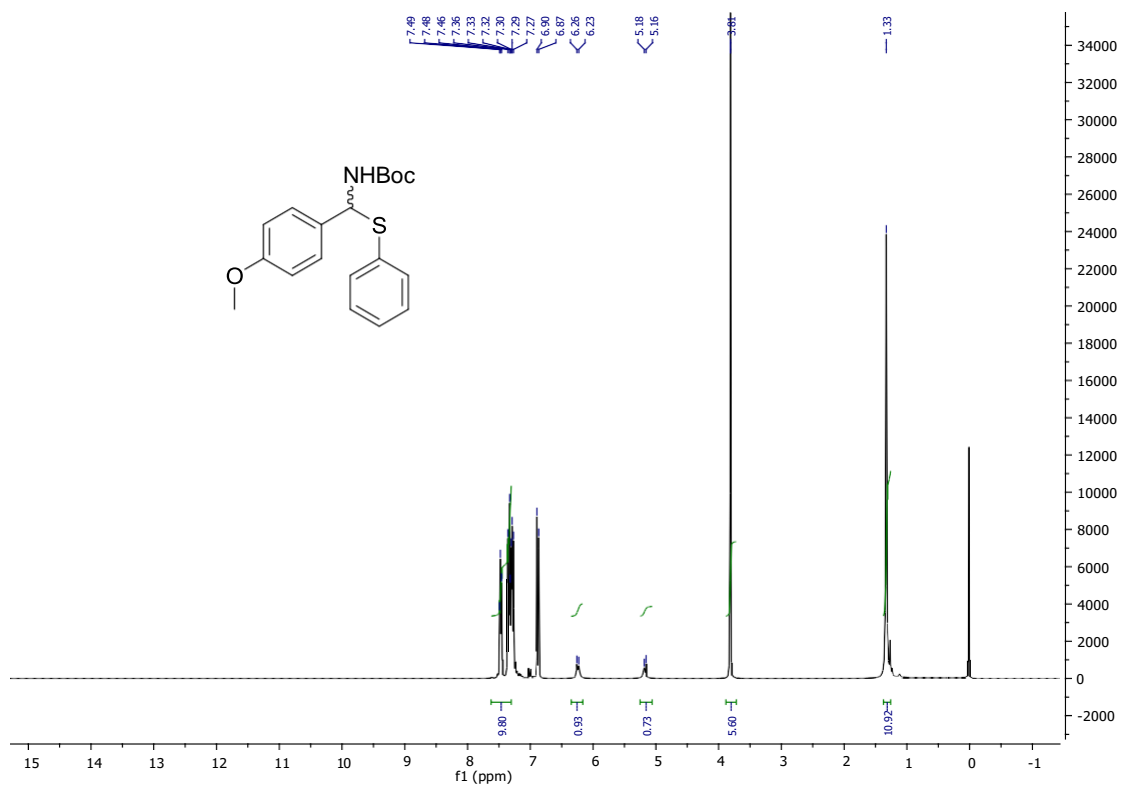


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H para o compost *tert*-butil ((4-metoxifenil)(feniltio)metil)carbamato.

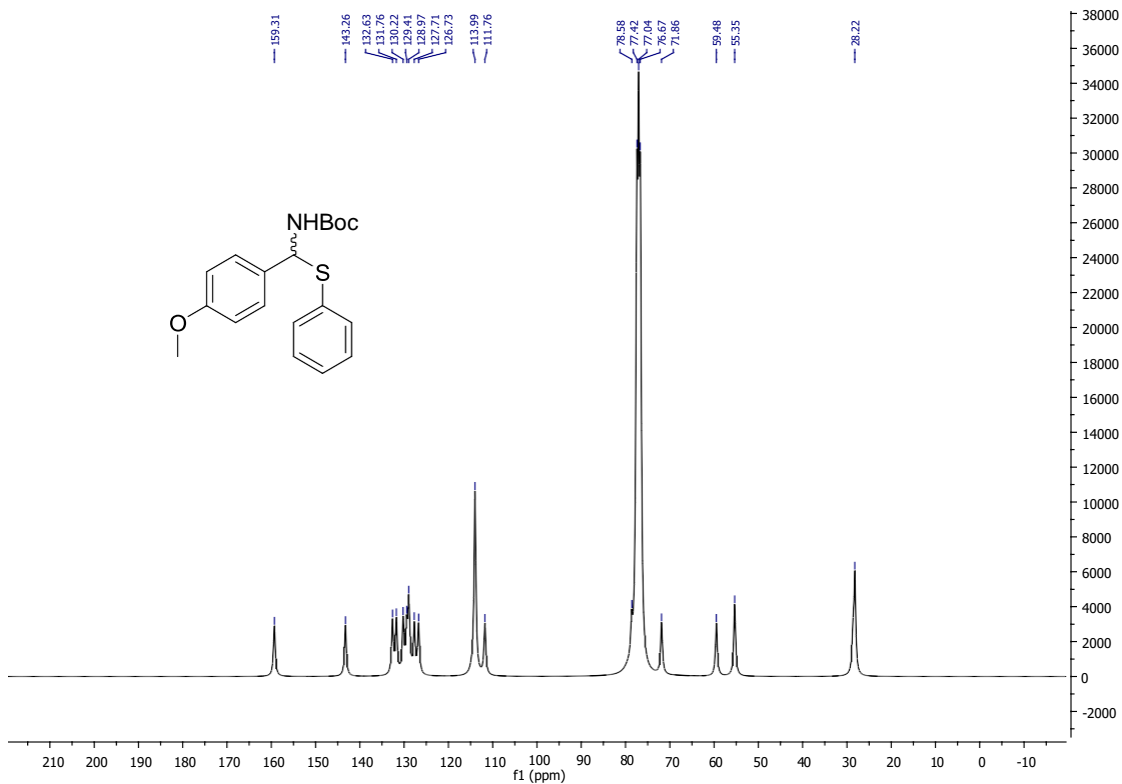


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C para o compost *tert*-butil ((4-metoxifenil)(feniltio)metil)carbamato.

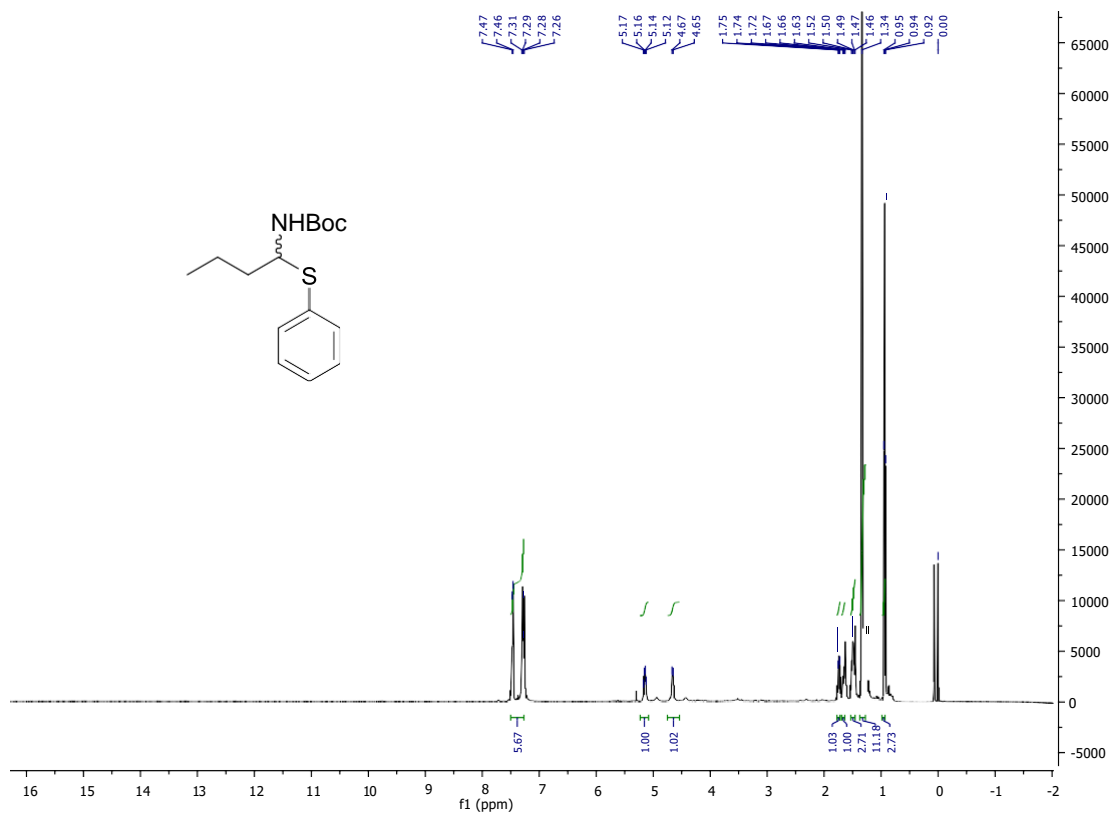


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil (1-(feniltio)butil)carbamato.

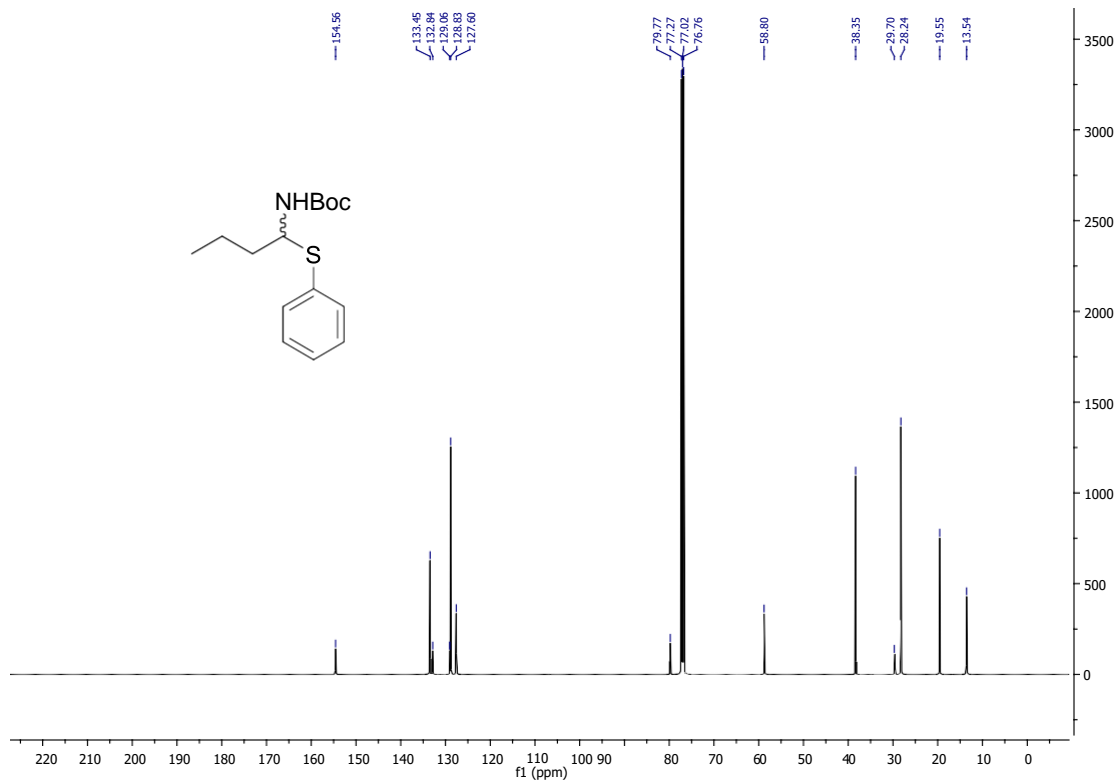


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (1-(feniltio)butil)carbamato.

Supporting information

O processo de síntese química em fluxo contínuo para *N*, *S*-acetais e a avaliação contra células cancerosas de melanoma

Tábata B. de Albuquerque, Beatriz A. L. da Silva, Beatriz F. dos Santos, Aline R. de Oliveira, David T. H. de Castro, Kely Picoli-Souza, Edson L. dos Santos, e Nelson L. C. Domingues*

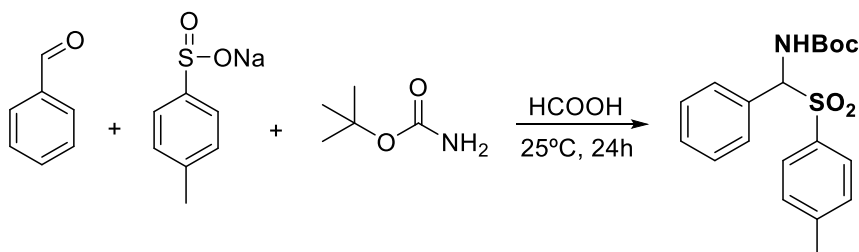
| | |
|---|--------------------------------------|
| 1. PROCEDIMENTO GERAL | Erro! Indicador não definido. |
| 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 2 |
| 2.1. Procedimento geral para a síntese de <i>N</i> -Boc-Iminas | 2 |
| 2.2. Imobilização de lipase pâncreas suíno sobre organossilicato de magnésio..... | 2 |
| 2.3. Procedimento geral para adição de tióis a <i>N</i> -Boc-Iminas..... | 3 |
| 3. ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA de RMN de ¹ H e ¹³ C | 3 |

1. PROCEDIMENTO GERAL

Todas as outras reações foram realizadas com reagentes químicos e solventes sem nenhum tratamento específico. As respectivas reações foram monitoradas por cromatografia em camada fina (TLC) MACHEREY-NAGEL (SIL G / UV₂₅₄) e foram visualizados por extinção de fluorescência com luz UV a 254 nm. A purificação dos compostos foi realizada por cromatografia em sílica gel (eluente: hexano/EtOAc, 90:10). Espectros de RMN ¹H and ¹³C RMN foram realizados em CDCl₃ on Bruker (300 MHz and 75 MHz respectivamente) espectrômetro. Os dados de ¹H RMN são descritos da seguinte forma: deslocamento químico (δ , ppm), multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, q = quarteto, m = multipeto), constantes de acoplamento (*J*) e atribuição. O espectro de infravermelho foi analisado em um espectrômetro FT/IR 4100 tipo A Jasco.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Geral Procedimento para *N*-Boc-Iminas



Em um frasco de 50 mL foi adicionado aldeído (5.76 mmol), para-toluenosulfinato de sódio (5.76 mmol), *tert*-butil carbamato (5.76 mmol) e HCO₂H (217 μL). A mistura foi agitada magneticamente em CH₃OH (5 mL) e água (10 mL) a temperatura ambiente por 24 horas. Depois de completo, o sólido foi filtrado e lavado com éter e seco durante à noite (rendimento de 95%).¹

Referência da literatura anterior

1 Wang, H. Y, Zhang, J. X, Cao, D. D and Zhao, G. Enantioselective Addition of Thiols to Imines Catalyzed by Thiourea–Quaternary Ammonium Salts. *ACS Catalysis*, **2013** 3 (10), 2218-2221.

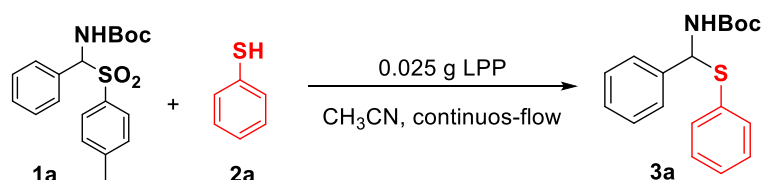
2.2. Imobilização de lipase de pâncreas suíno sobre organossilicato de magnésio

A síntese de suporte de MgCl₂ foi realizada seguindo o trabalho publicado por Jasra e colaboradores². MgCl₂ (8.36 g) foi dissolvido em um recipiente contendo metanol (200 mL) e a solução foi agitada 25 °C por 10 minutos. Em outro recipiente, APTES (9.8 g, 10.35 mL) foi dissolvido em metanol (50 mL). Esta solução foi adicionada gota a gota ao MgCl₂, com a mistura resultante formando uma suspensão branca. Então, uma solução de NaOH 0.5 M foi adicionada lentamente sob agitação a 25 °C até o pH atingir 10.5. A suspensão obtida foi deixada em repouso por 1 semana em 25 °C e o gel obtido foi centrifugado, lavado com água destilada e seco em estufa a 65 °C. Em seguida, o processo de imobilização foi realizado segundo adaptação do processo descrito por Demir e colaboradores³. Em um béquer, 1 g do organossilicato de magnésio e 25 mL de glutaraldeído foram adicionados e a suspensão foi agitada por 1 hora a temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada com o objetivo de remover todo o glutaraldeído e o sólido foi lavado com água destilada (3 vezes). O sólido resultante foi transferido para um béquer de 50 mL e adicionado uma solução de 0,45 g de Lipase de pâncreas suína dissolvida em 10 mL de água destilada. A mistura foi agitada por agitador orbital durante 12 horas à temperatura ambiente, filtrada e lavada com água destilada (25mL x 3 vezes). A enzima imobilizada foi seca a vácuo por 24h e mantida sob refrigeração a 5° C até o seu uso.

Referências da Literatura anterior

2. H. A. Patel, S. K. Sharma, R. V. Jasra, J. Molec. Catal. A: Chemical **2008**, 286, 31- 40.
3. S. Demir, S. B. Gök, M. V. Kahraman, Starch **2012**, 64, 3-9.

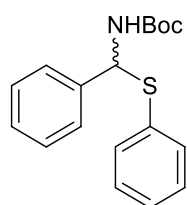
2.3. Procedimento geral para adição de tiois a *N*-Boc-Iminas



Em um tubo reacional foi adicionado Tiol (0.2 mmol), amidossulfona (0.1 mmol), K₂CO₃ (0.5 mmol) e enzima (0.025g) em CH₃CN (20 mL) a temperatura ambiente em um sistema de fluxo contínuo usando um MasterFlex L/S 14 modelo de reator 07516 -10. A reação foi agitada por fluxo contínuo e monitorada por CCD (eluente: hexano/EtOAc, 90:10). Quando a reação foi completada, a mistura foi extraída com DCM (3x10 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas, sobre Na₂SO₄ anidro; o sal foi removido por filtração e a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna em sílica gel (eluente: hexano/EtOAc, 90:10).

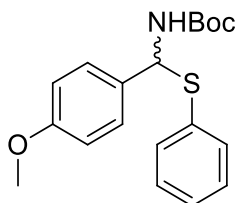
3. Análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C

tert-butil (fenil(feniltio)metil)carbamato:



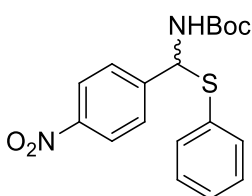
Sólido Branco. MW: 315.13 g/mol. C₁₈H₂₁NO₂S. **IV** (KBr) ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3358, 2959, 1689, 1165, 1086, 1021, 876, 825, 798. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.35 (s, 9H), 5.22-5.25 (d, *J*= 9 Hz, 1H), 6.32-6.29 (d, *J*=9 Hz, 1 H), 7.30-7.52 (m, 10H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.17, 61.21, 126.44, 127.74, 128.01, 128.19, 128.62, 128.90, 132.93, 133.39, 139.02, 139.17, 154.21.

tert-butil ((4-metoxifenil)(feniltio)metil)carbamato:



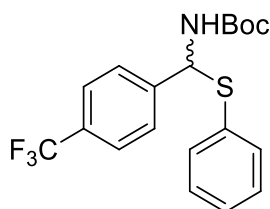
Sólido Branco. MW: 345.14 g/mol. C₁₉H₂₃NO₃S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3352, 2966, 1689, 1617, 1505, 1250, 1165, 1014, 883, 837. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ ppm, 1.33 (s, 9H), 3.81 (s, 3H), 5.16-5.19 (d, *J*= 9 Hz, 1H), 6.23-6.26 (d, *J*= 9 Hz, 1H), 6.87-7.49 (m, 9H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.22, 55.35, 59.48, 111.76, 113.99, 126.73, 127.71, 128.97, 129.41, 130.22, 131.76, 132.63, 143.26, 159.31.

terc-butil ((4-nitrofenil)(feniltio)metil)carbamato:



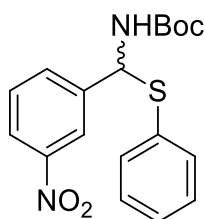
Sólido Branco. PM: 360.11 g/mol. C₁₈H₂₀N₂O₄S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3358, 2959, 1682, 1512, 1362, 1263, 1171, 1093, 1014, 883, 825. ¹H **RMN** (500 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.27 (s, 9H), 5.10-5.12 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.17-6.19 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.14-7.34 (m, 9H). ¹³C **RMN** (125 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.18, 28.24, 29.71, 61.66, 126.47, 128.39, 128.75, 129.08, 129.18, 129.76, 130.79, 131.46, 134.48, 134.92, 138.73.

terc-butil ((feniltio)(4-(trifluorometil)fenil)metil)carbamato:



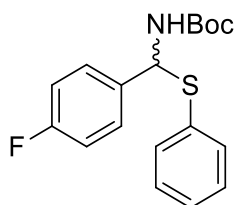
Sólido Branco. PM: 383.12 g/mol. C₁₉H₂₀FNO₂S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3352, 2979, 1682, 1505, 1329, 1256, 1165, 1126, 1067, 851, 791. ¹H **RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.34 (s, 9H), 5.18-5.21 (d, J = 9 Hz, 1H), 6.27-6.30 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.26-7.62 (m, 9H). ¹³C **RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.31, 60.93, 122.17, 125.68, 126.94, 128.48, 129.05, 130.04-130.56 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 39 Hz), 132.31, 133.54, 143.15, 154.27.

terc-butil ((3-nitrofenil)(feniltio)metil)carbamato:



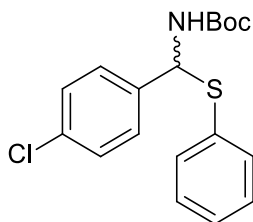
Sólido Branco. PM: 360.11 g/mol. C₁₈H₂₀N₂O₄S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3358, 2966, 1689, 1590, 1518, 1362, 1224, 1171, 1021, 883, 837. ¹H **RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.35 (s, 9H), 5.20-5.23 (d, J = 8 Hz, 1H), 6.21-6.24 (d, J = 9.40 Hz, 1H), 6.99-7.51 (m, 9H). ¹³C **RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.18, 62.17, 115.88, 116.23, 126.47, 127.93, 128.70, 136.49, 138.86, 154.06, 161.91.

terc-butil ((4-fluorofenil)(feniltio)metil)carbamato:



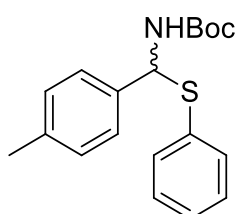
Sólido Branco. PM: 333.12 g/mol. C₁₈H₂₀FNO₂S. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3358, 2979, 1689, 1499, 1368, 1230, 1165, 1021, 876, 844. ¹H **RMN** (300 MHz, CDCl₃): 1.36 (s, 1H), 5.22-5.25 (d, J = 9 Hz, 1H), 6.21-6.24 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.00-7.58 (m, 9H). ¹³C **RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ ppm 28.19, 60.12, 115.39-115.67 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 21 Hz), 128.20, 128.42, 129.08, 129.39, 132.68, 133.23, 135.02, 160.75, 164.02.

terc-butil ((4-clorofenil)(feniltio)metil)carbamato:



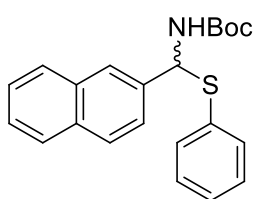
Sólido Branco. PM: 349.09 g/mol. $C_{18}H_{20}ClNO_2S$. IR KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3358, 2966, 16682, 1505, 1263, 1159, 1014, 883. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.35 (s, 9H), 5.17-5.20 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 6.23-6.26 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.25-7.56. $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 154.18, 137.75, 133.89, 133.43, 132.58, 130.99, 128.99, 128.78, 128.26, 127.92, 60.72, 28.18.

terc -butil ((feniltio)(p-tolil)metil)carbamato:



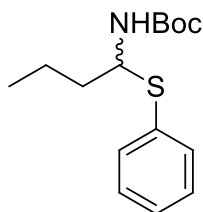
Sólido Branco. PM: 329.26 g/mol. $C_{19}H_{23}NO_3S$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3352, 2966, 1689, 1617, 1505, 1250, 1165, 1014, 883, 837. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.27 (s, 9H), 2.28 (s, 3H), 5.10-5.13 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 6.13-6.16 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.01-7.52 (m, 9H). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 21.13, 28.25, 100.17, 126.49, 128.12, 128.61, 129.02, 129.17, 129.74, 131.53, 134.07, 134.48, 159.28.

terc-butil (naftalen-1-il(feniltio)metil)carbamato:



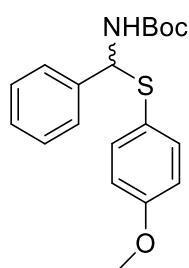
Sólido Branco. PM: 365.14 g/mol. $C_{22}H_{23}NO_2S$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3358, 2973, 1682, 1505, 1368, 1250, 1165, 1053, 1028, 883, 857. $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.37 (s, 9H), 5.44-5.47 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 6.98-7.02 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.34-7.65 (m, 12H). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 28.37, 58.42, 80.42, 123.53, 124.10, 125.03, 125.94, 126.59, 128.10, 128.97, 129.08, 129.99, 133.19, 133.39, 133.87, 134.82, 154.11.

terc-butil (1-(feniltio)butil)carbamato:



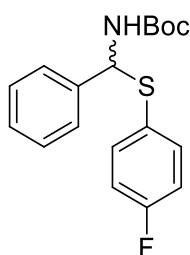
Sólido Branco. PM: 281.41 g/mol. $C_{15}H_{23}NO_2S$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3367, 1681, 1586, 1490, 1362, 1290, 1168, 1026, 875, 826. $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ ppm 0.92-0.95 (m, 3H), 1.34-1.47 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.47-1.75 (m, 2H), 4.65-4.67 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 5.12-5.17 (dd, $J = 10$ Hz, 1H), 7.26-7.47 (m, 5H). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 13.53, 19.55, 28.35, 38.46, 58.79, 79.78, 127.60, 128.83, 132.84, 133.45, 154.21.

terc-butil (((4-metoxifenil)tio)(fenil)metil)carbamato:



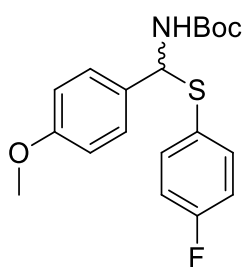
Sólido Branco. PM: 345.14 g/mol. $C_{19}H_{23}NO_3S$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3367, 1681, 1586, 1490, 1362, 1290, 1168, 1026, 875, 826. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.36 (s, 9H), 3.82 (s, 3H), 5.23-5.25 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 6.14-6.16 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 6.83-7.44 (m, 9H). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ ppm 28.25, 55.38, 62.25, 114.64, 123.15, 128.07, 128.44, 128.58, 129.02, 129.76, 132.43, 132.68, 134.46, 136.63, 139.27.

terc-butil (((4-fluorofenil)tio)(fenil)metil)carbamato:



Sólido Branco. PM: 333.12 g/mol. $C_{18}H_{20}FNO_2S$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3361, 1688, 1510, 1349, 1287, 1168, 1020, 882, 829. ^1H RMN (300 MHz, DMSO): δ ppm 1.35 (s, 1H), 5.22-5.25 (d, $J = 9$, 1H), 6.29-6.32 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.30-7.52 (m, 9H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ ppm 28.20, 28.92, 61.55, 115.53, 118.58, 128.30, 129.04, 132.75, 133.30, 160.77-164.05 (d, $J_{\text{C-F}} = 245.25$).

terc-butil (((4-fluorofenil)tio)(4-metoxifenil)metil)carbamato:



Sólido Branco. PM: 363.45g/mol. $C_{19}H_{22}FNO_3S$. **IV** KBr ($\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}): 3354, 2966, 1684, 1504, 1458, 1391, 1370, 1302, 1245, 1220, 1166, 1018, 886. ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): δ ppm 1.36 (s, 9H), 3.86 (s, 3H) 6.13-5.15 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 6.89-6.91 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 7.12-7.25 (m, 4H), 7.27-7.57 (m, 4H). ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO-d_6): δ ppm 28.46, 55.60, 61.82, 78.98, 114.98, 116.13, 116.99, 128.73, 131.29, 131.81, 132.28, 136.22-136.28 (d, $J_{\text{C-F}} = 136.25$ Hz), 154.84.

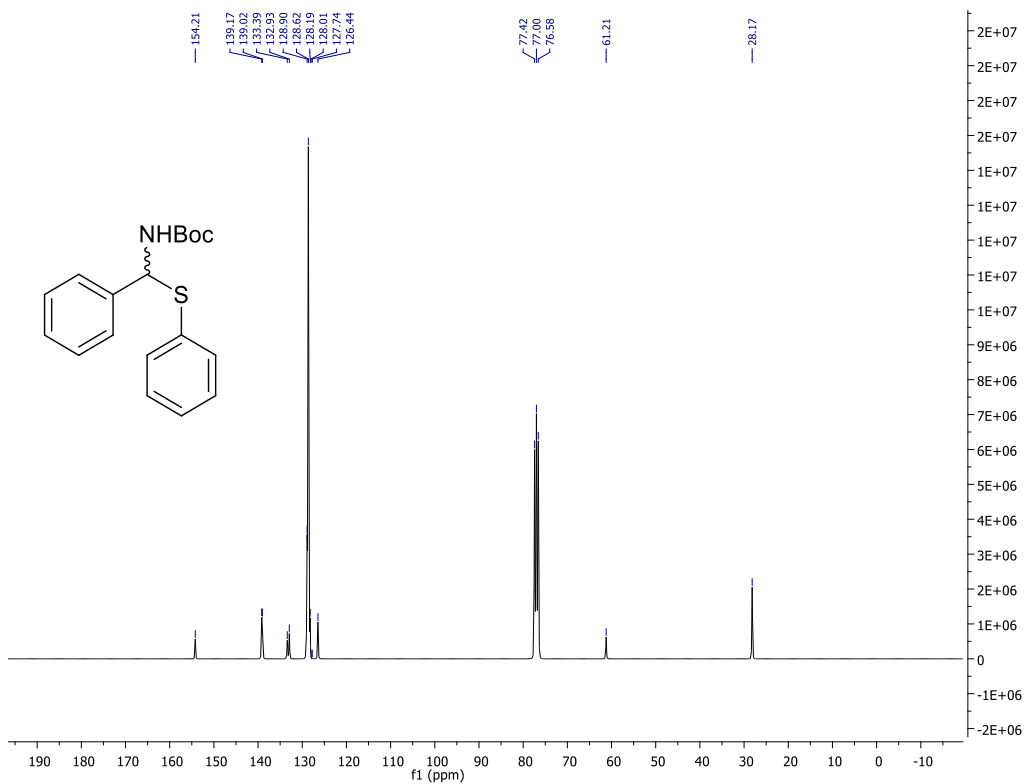


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil (fenil(feniltio)etil)carbamat.

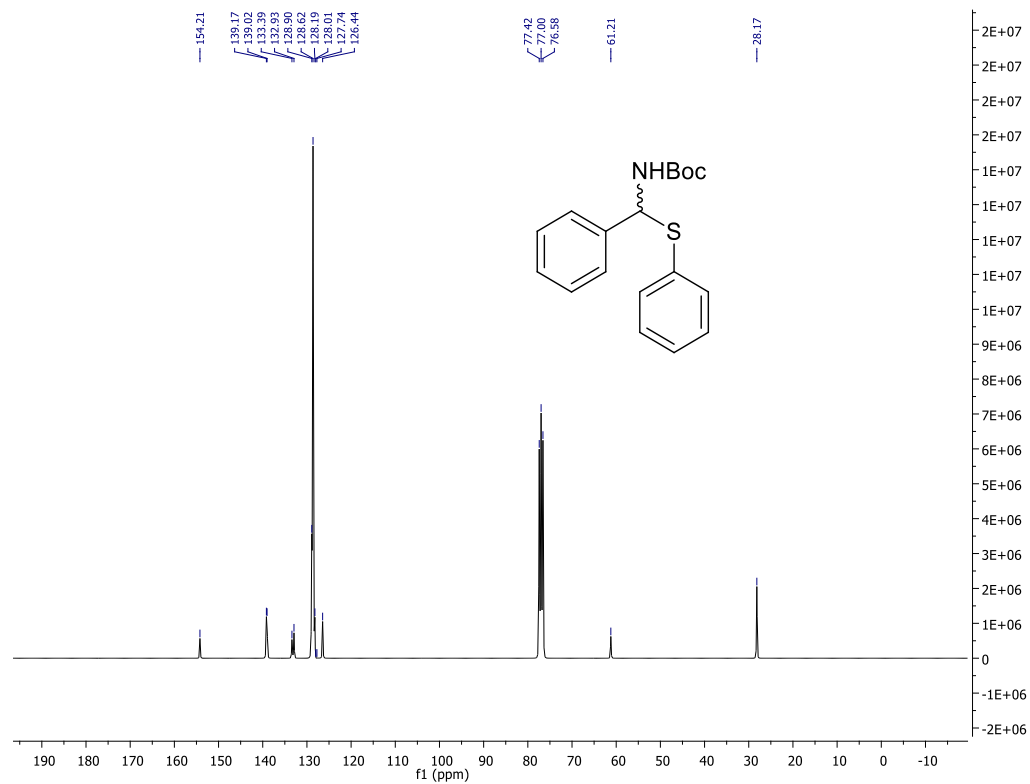


Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (fenil(feniltio)etil)carbamat.

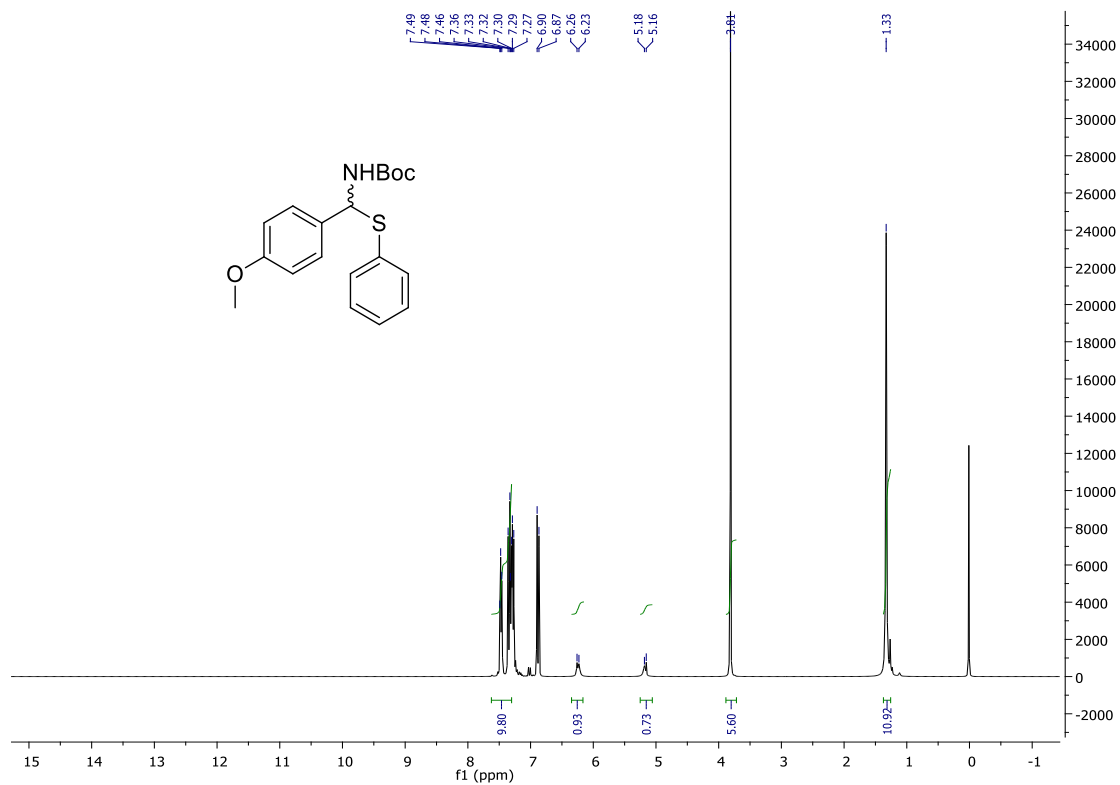


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((4-metoxifenil)(feniltio)metil)carbamato.

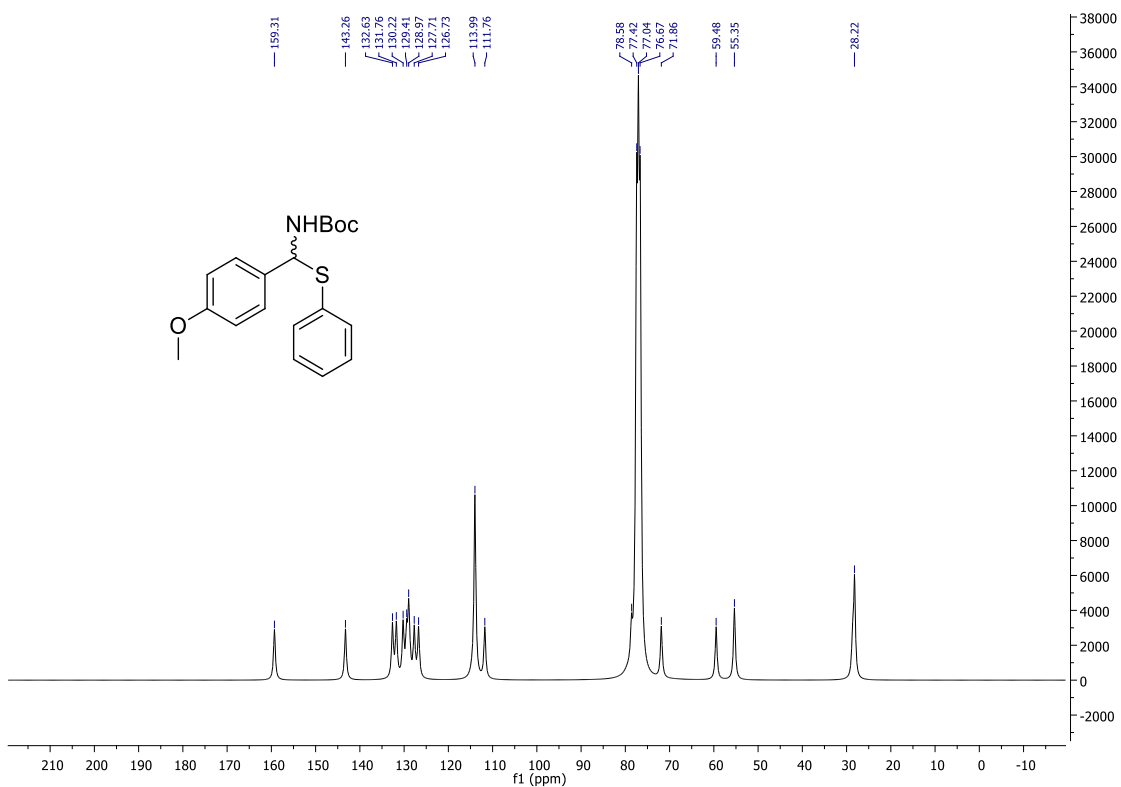


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((4-metoxifenil)(feniltio)metil)carbamato.

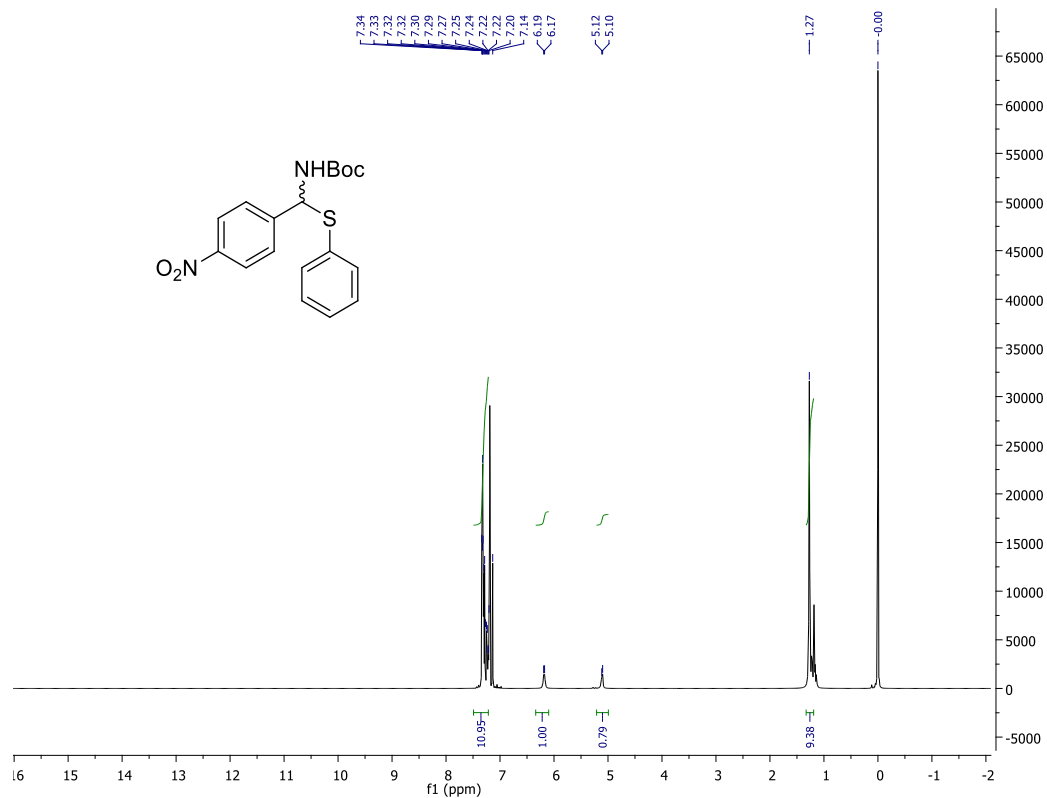


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((4-nitrofenil)(feniltio)metil)carbamato.

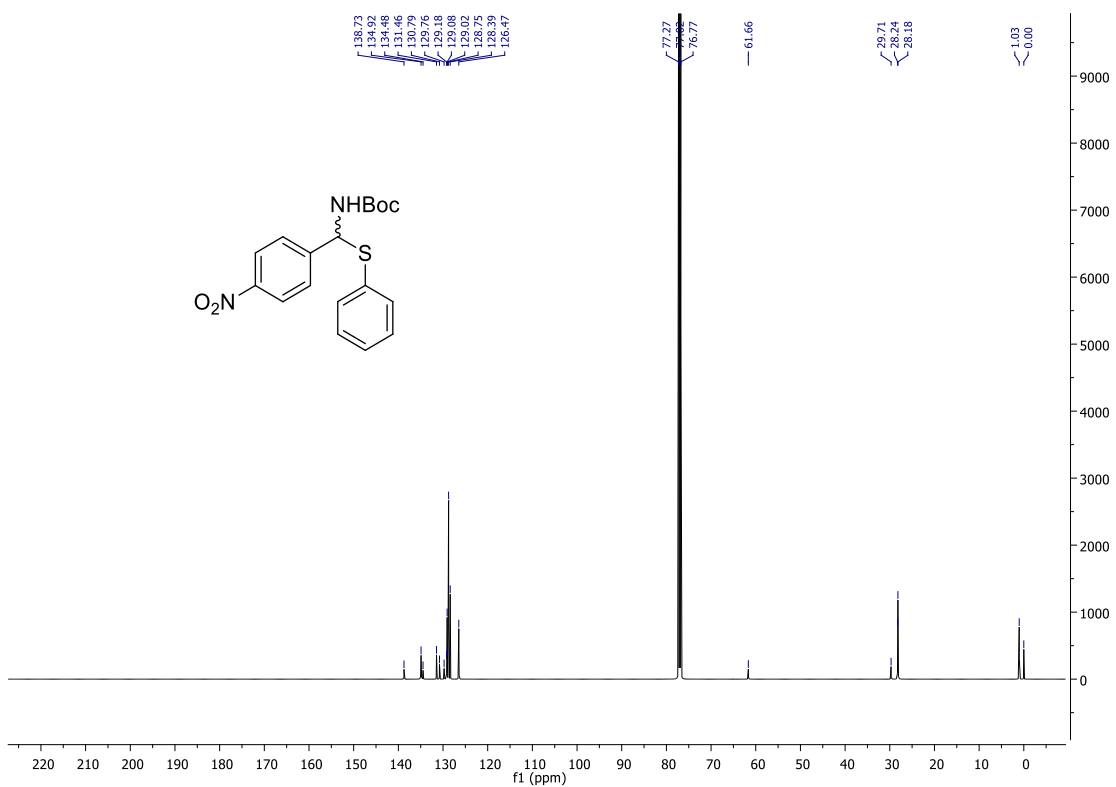


Figura 6. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((4-nitrofenil)(feniltio)metil)carbamato.

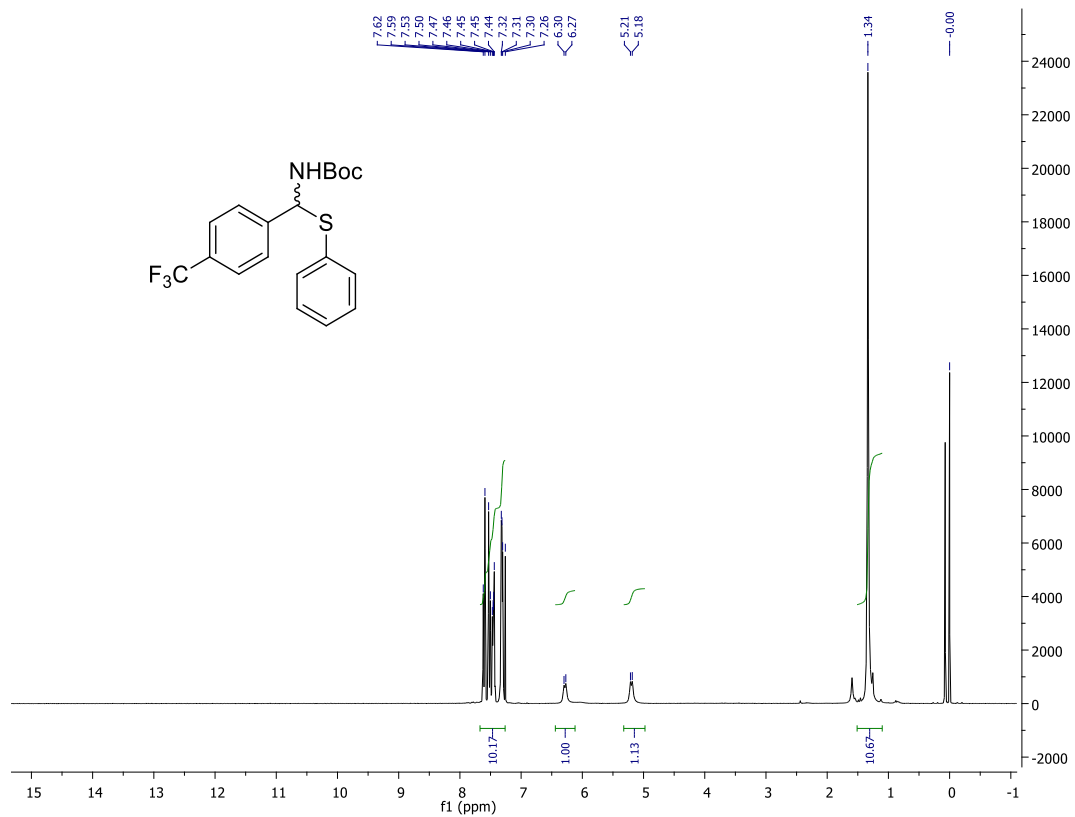


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((feniltio)(4(trifluorometil)fenil)metil)carbamato.

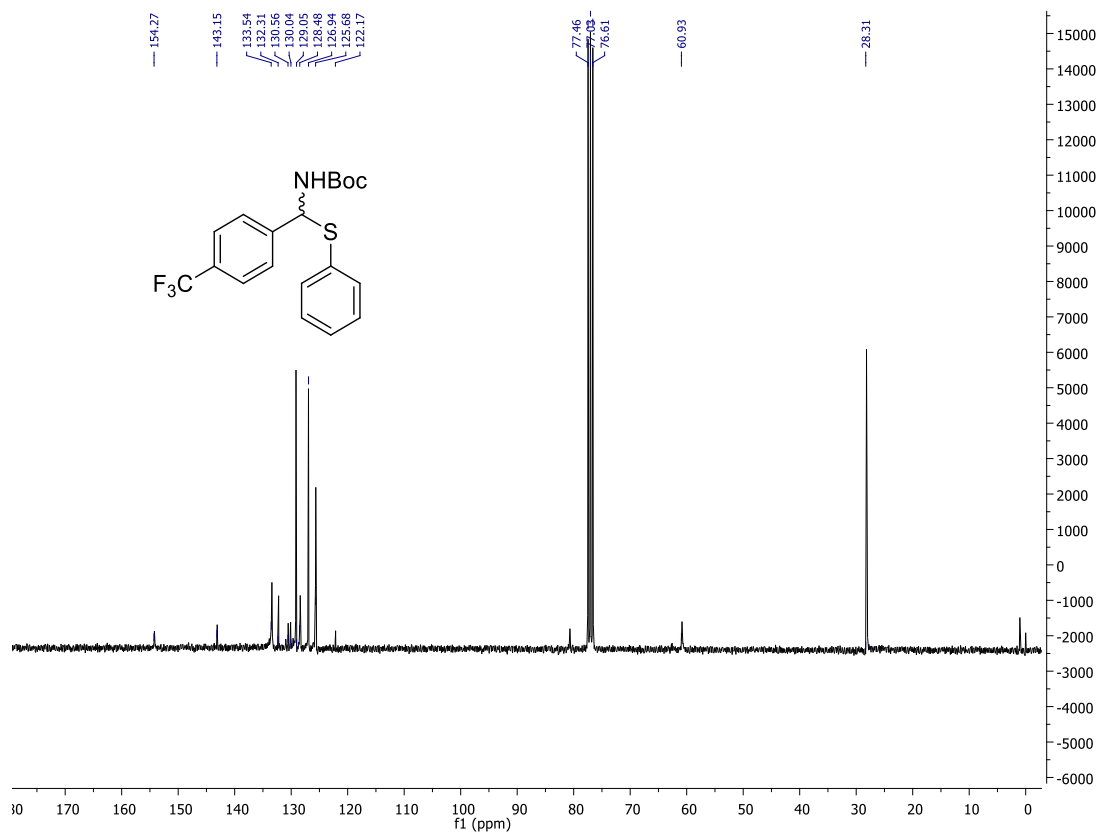


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((feniltio)(4(trifluorometil)fenil)metil)carbamato.

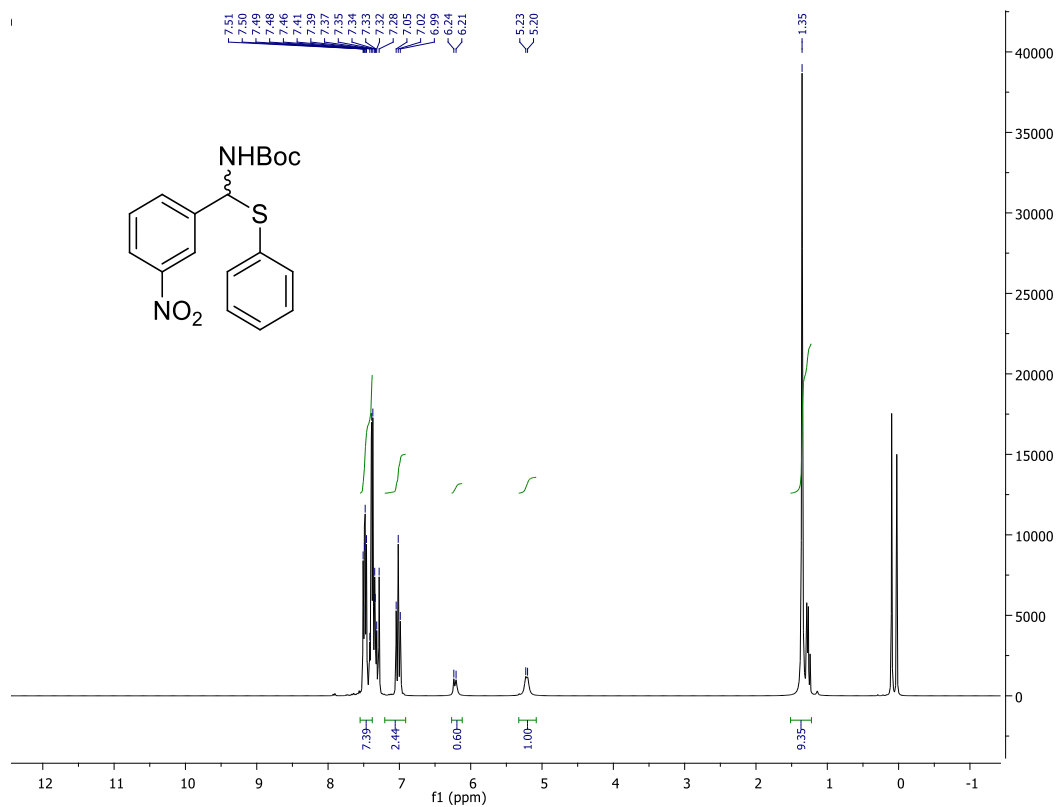


Figura 9. Espectro de RMN de ¹H para o composto *tert*-butil ((feniltio)(3-nitro)fenil)metil)carbamato.

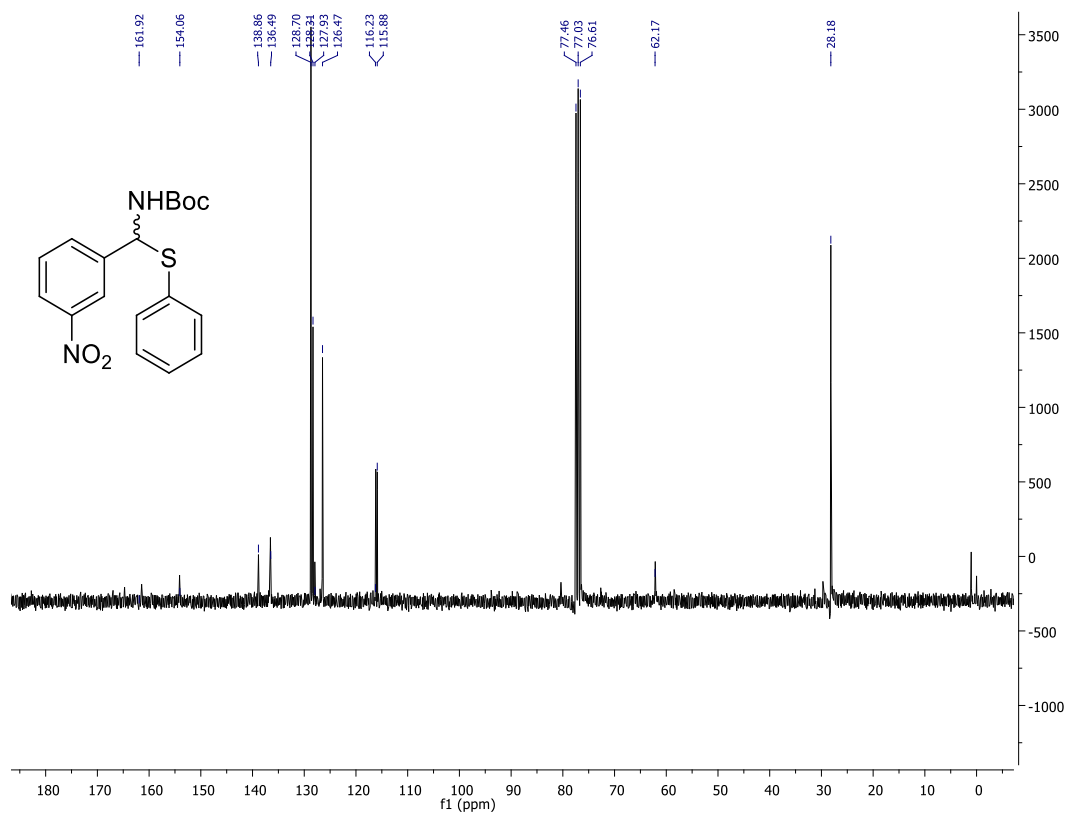


Figura 10. Espectro de RMN de ¹³C para o composto *tert*-butil ((feniltio)(3-nitro)fenil)metil)carbamato.

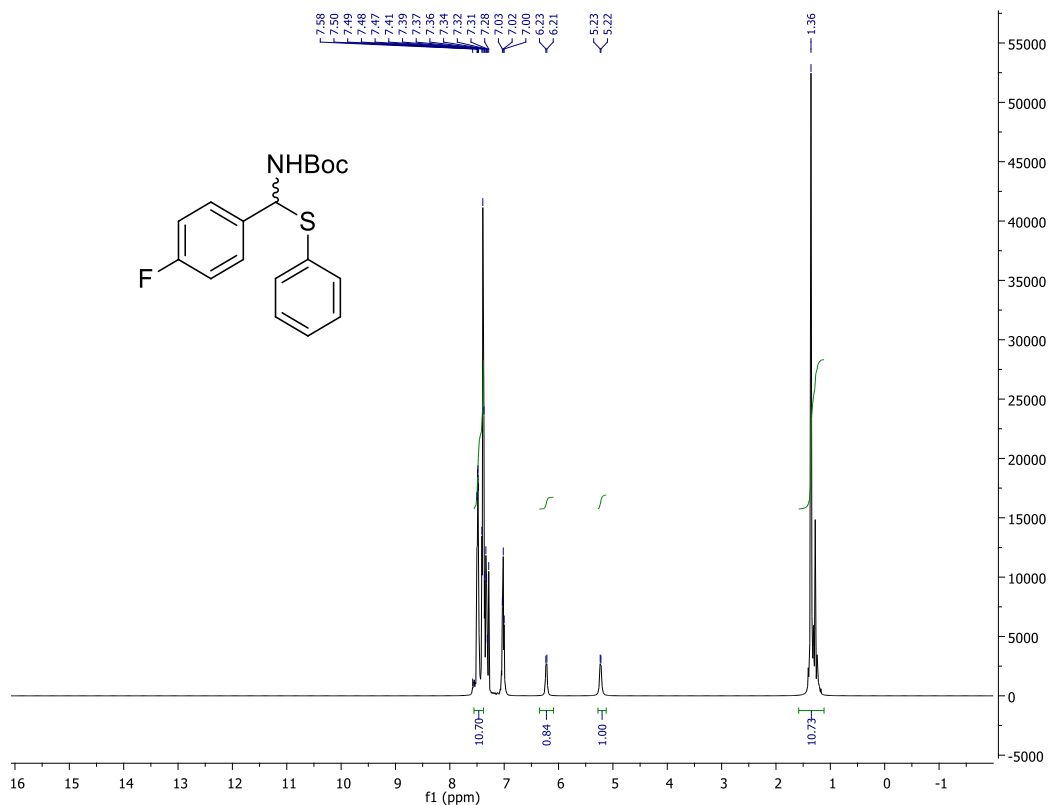


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((4-fluorfenil)(feniltio)metil)carbamato.

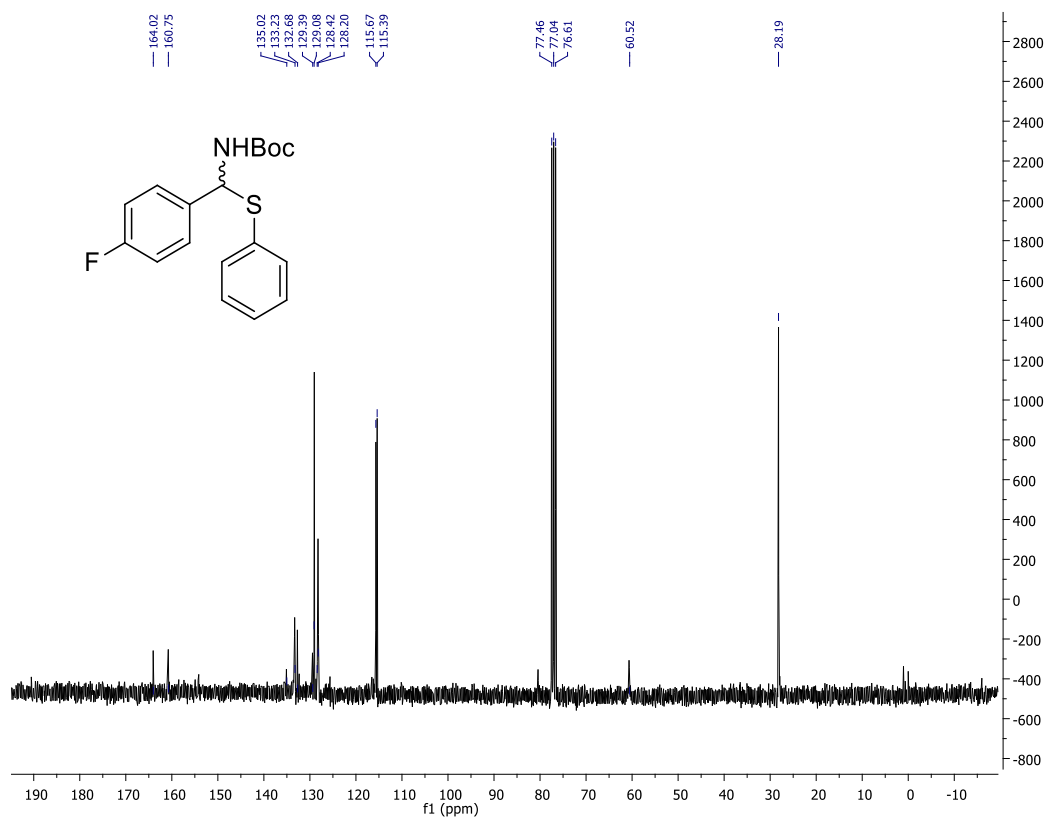


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((4-fluorfenil)(feniltio)metil)carbamato.

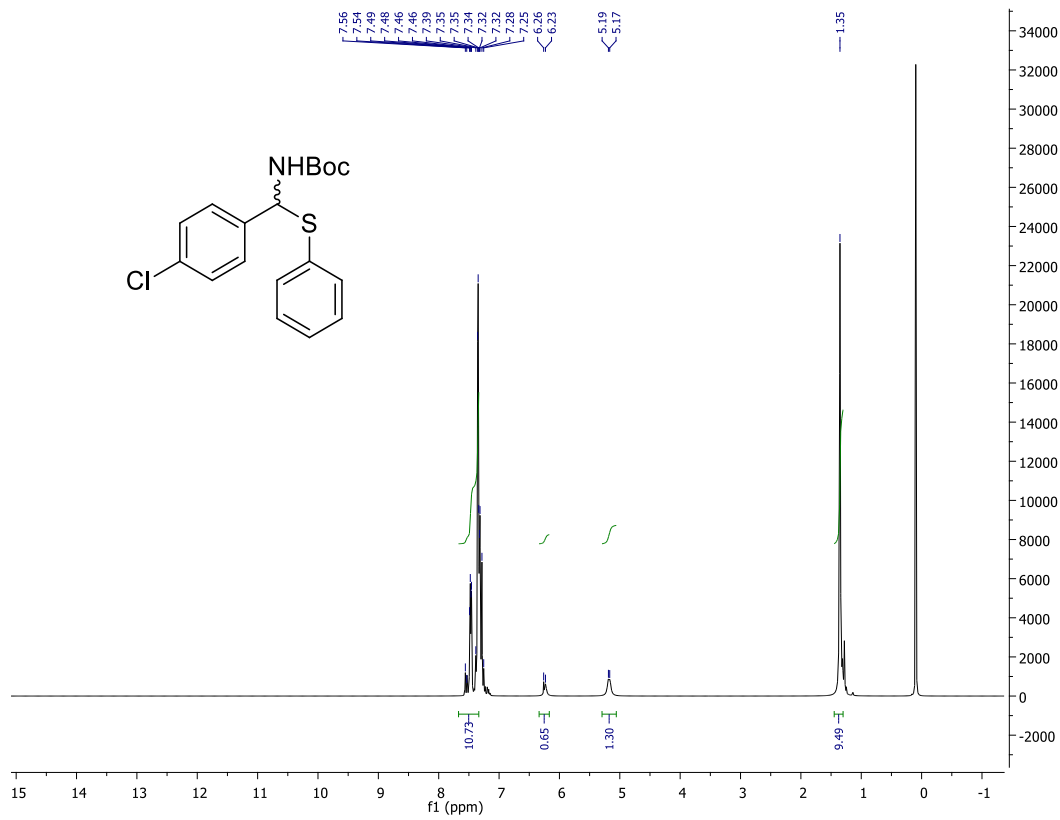


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((4-clorofenil)(feniltio)metil)carbamato.

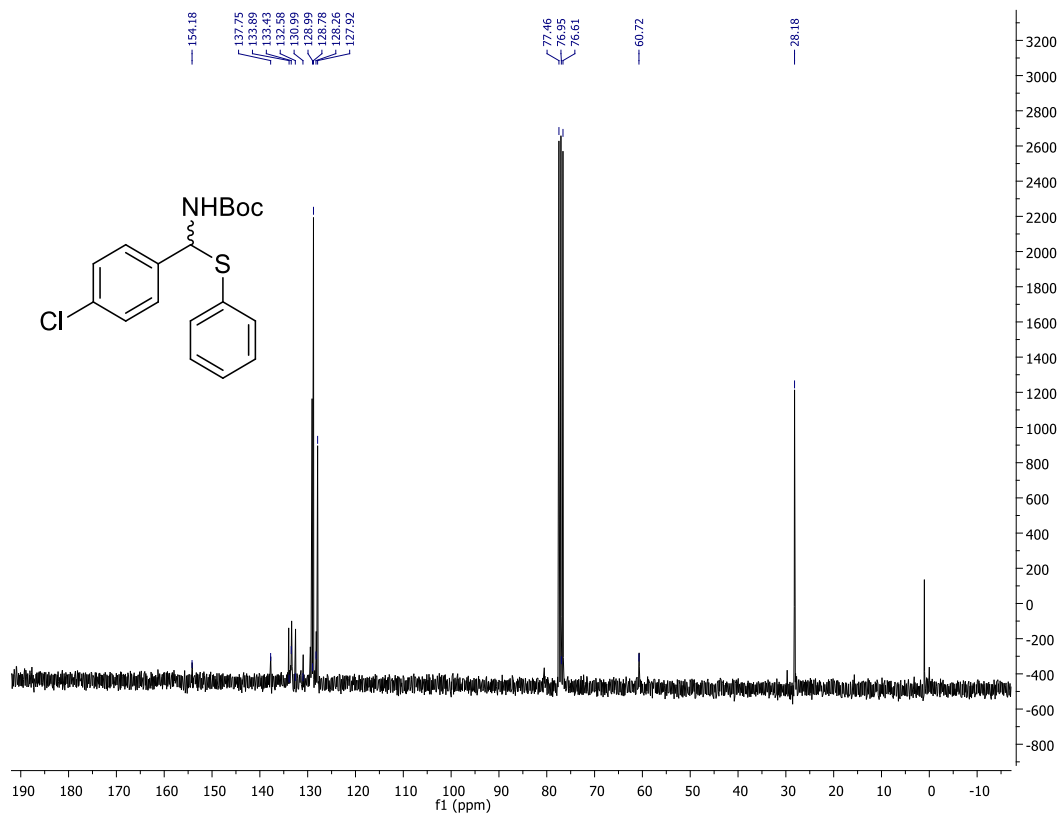


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((4-clorofenil)(feniltio)metil)carbamato

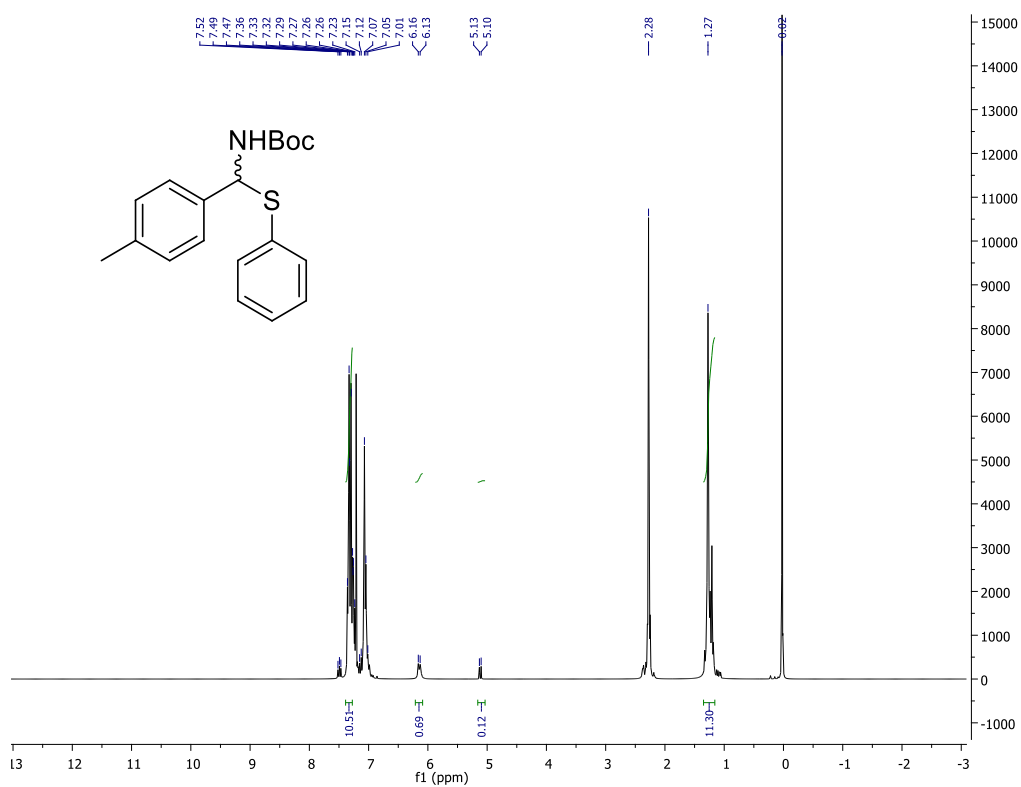


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil ((feniltio)(*p*-tolil)metil)carbamato.

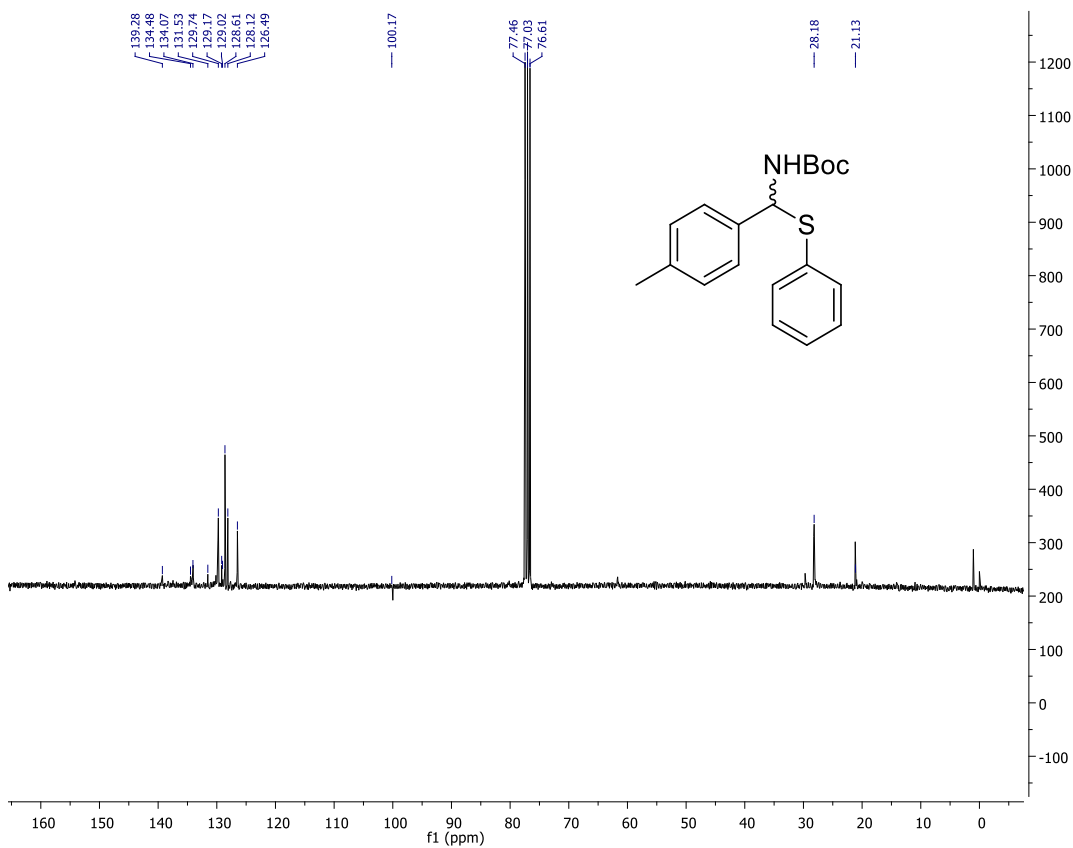


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil ((feniltio)(*p*-tolil)metil)carbamato.

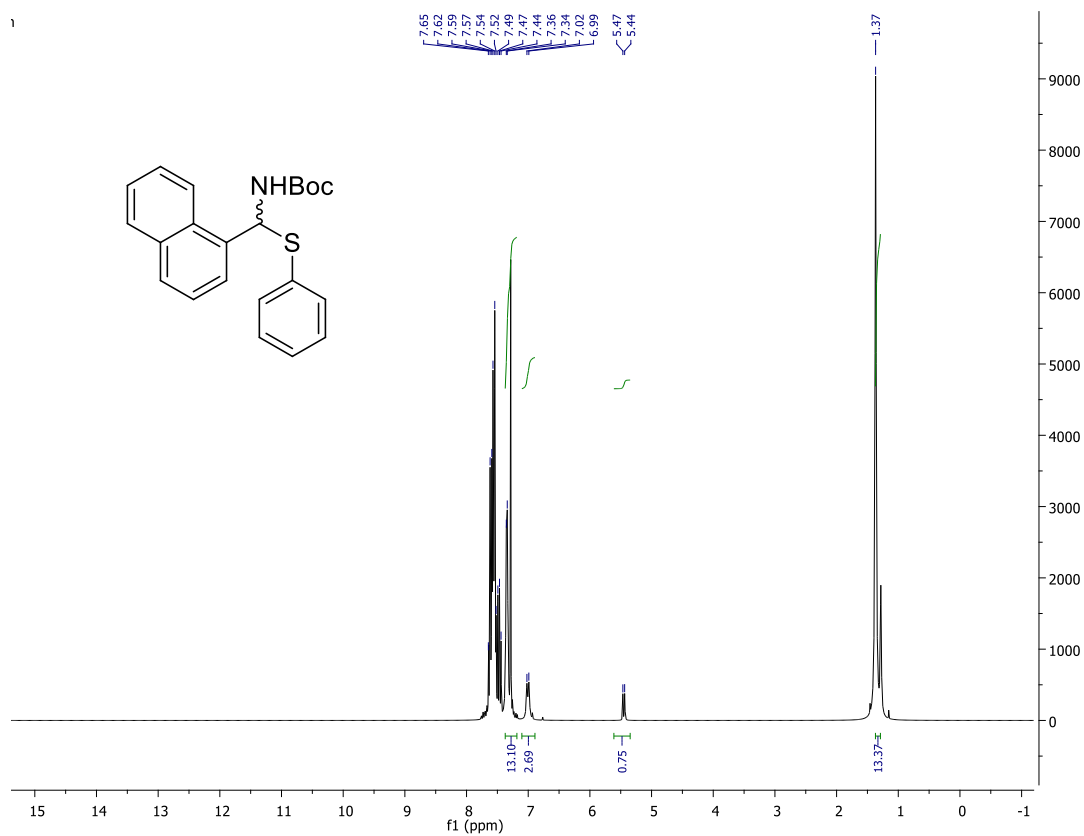


Figura 17. Espectro de RMN de ¹H para o composto *tert*-butil (naftalen-1-il(feniltio)metil)carbamato.

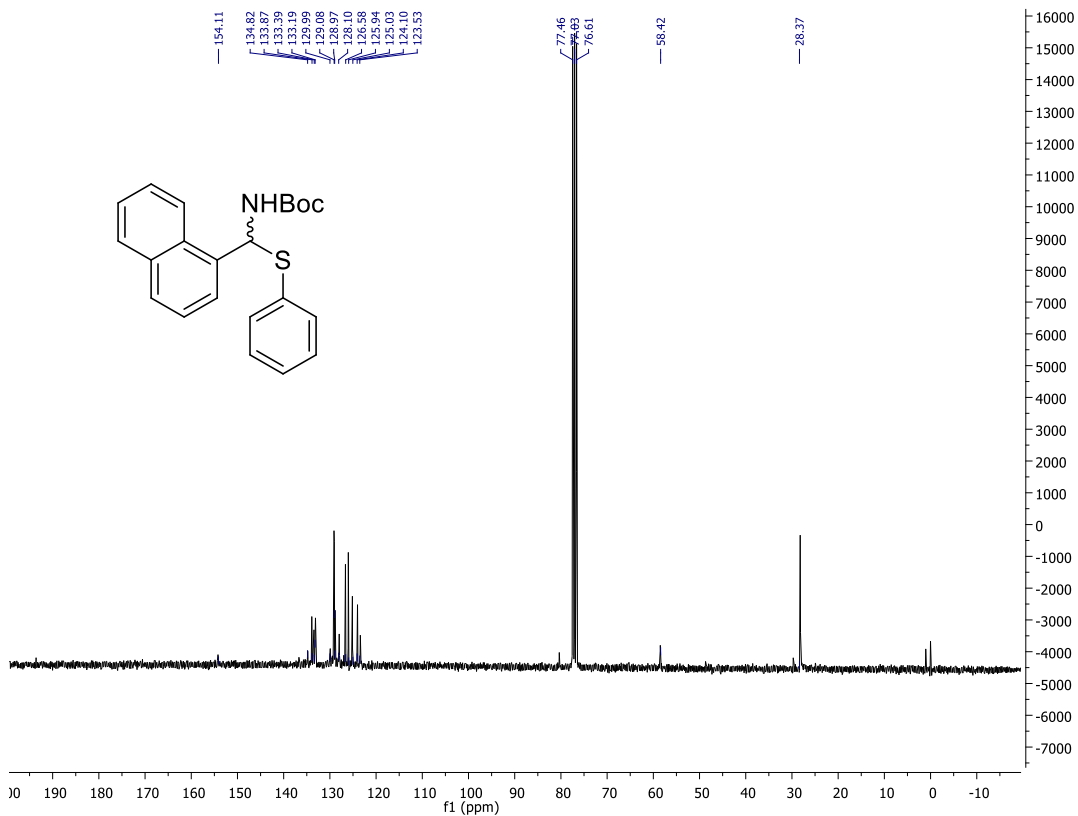


Figura 18. Espectro de RMN de ¹³C para o composto *tert*-butil (naftalen-1-il(feniltio)metil)carbamato

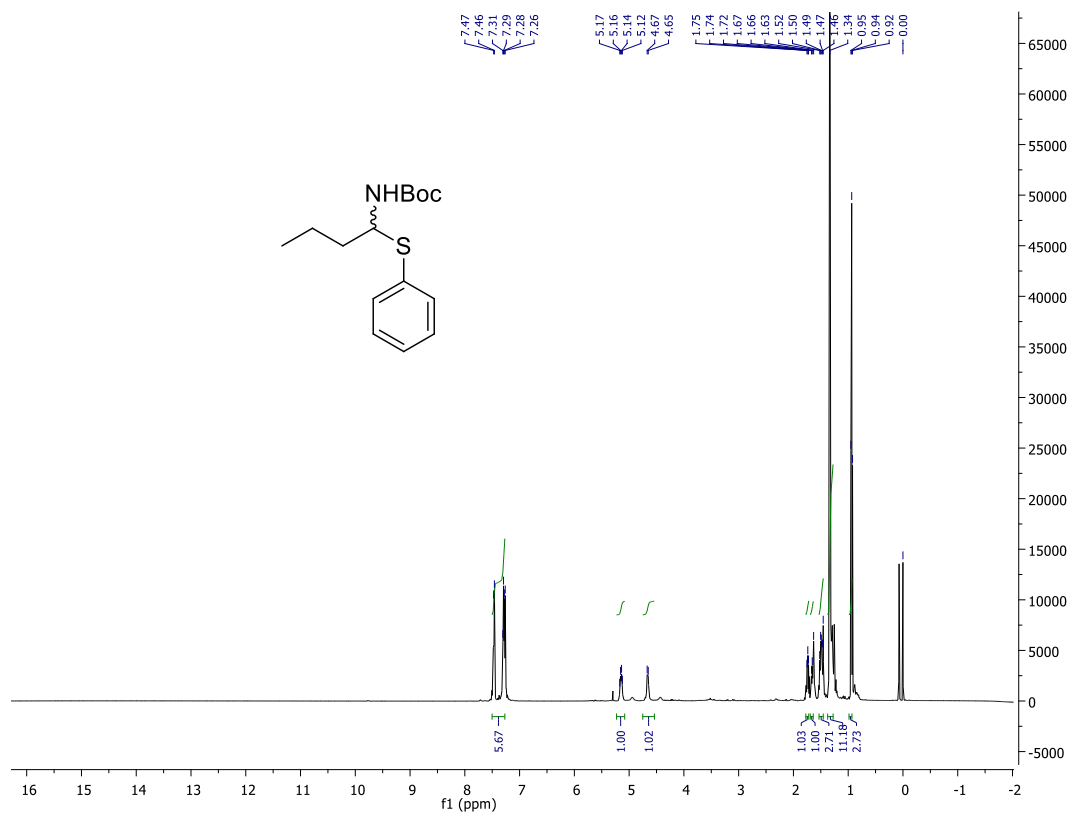


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil (1-(feniltio)butil)carbamato.

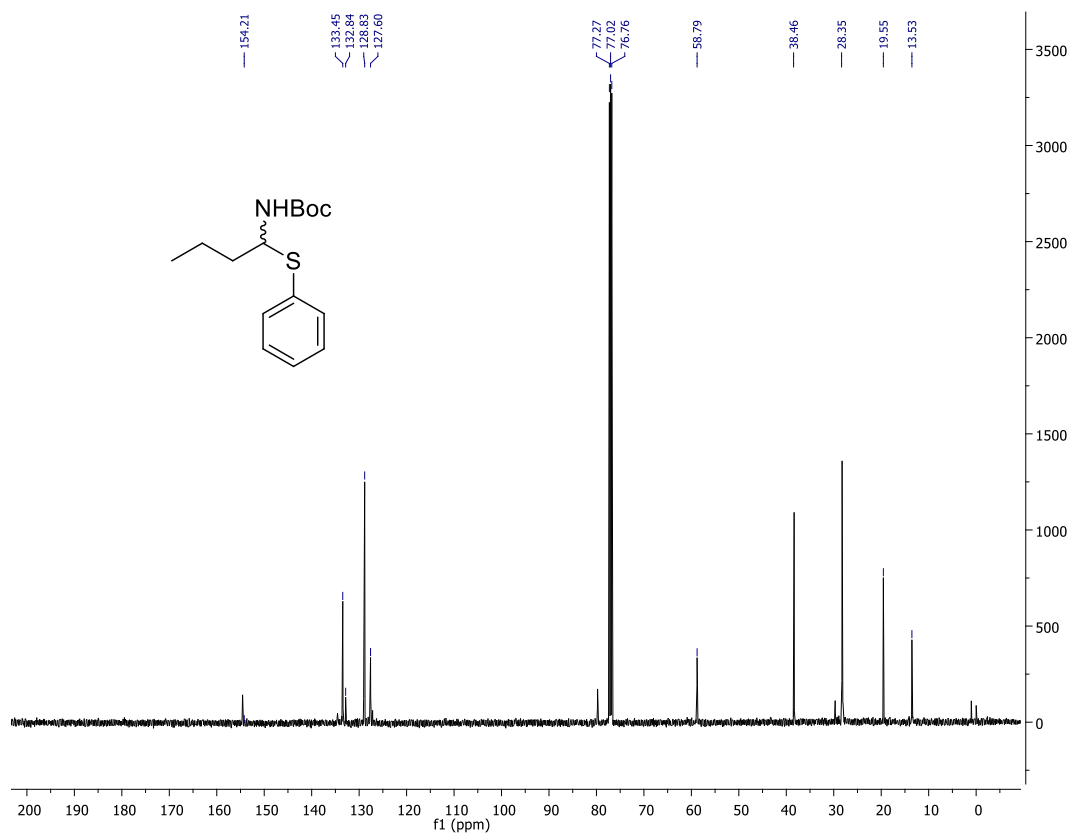


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (1-(feniltio)butil)carbamato.

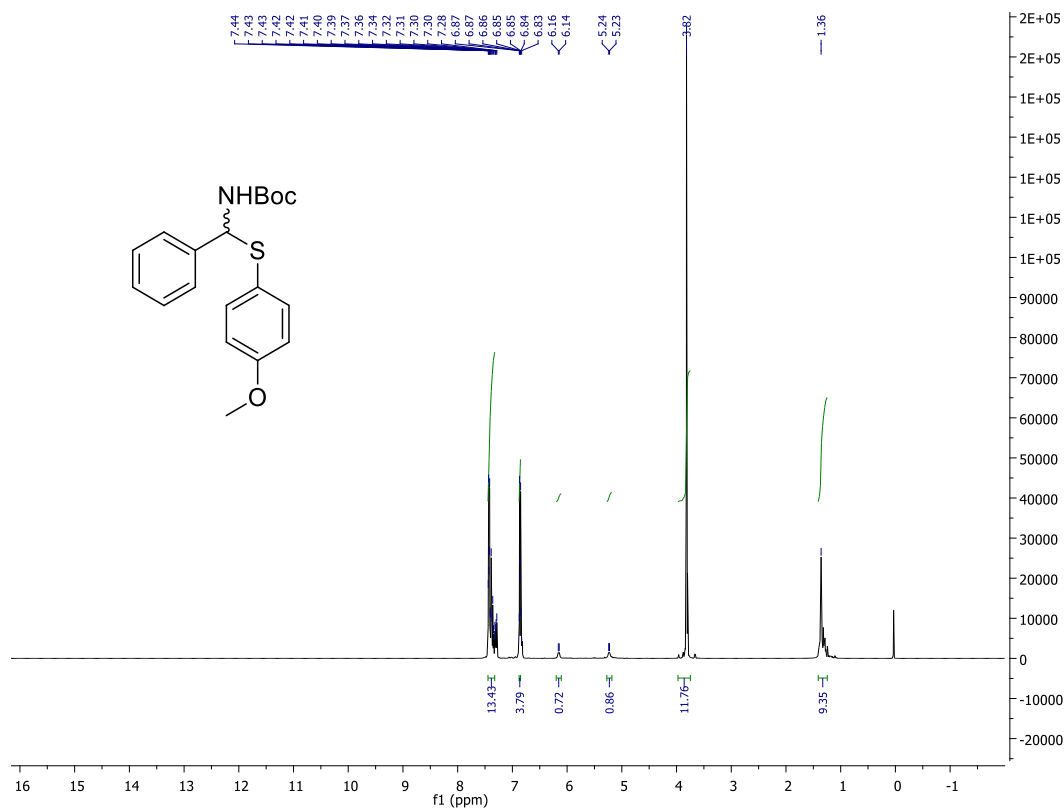


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil (((4-metoxifenil)tio)(fenil)metil)carbamato.

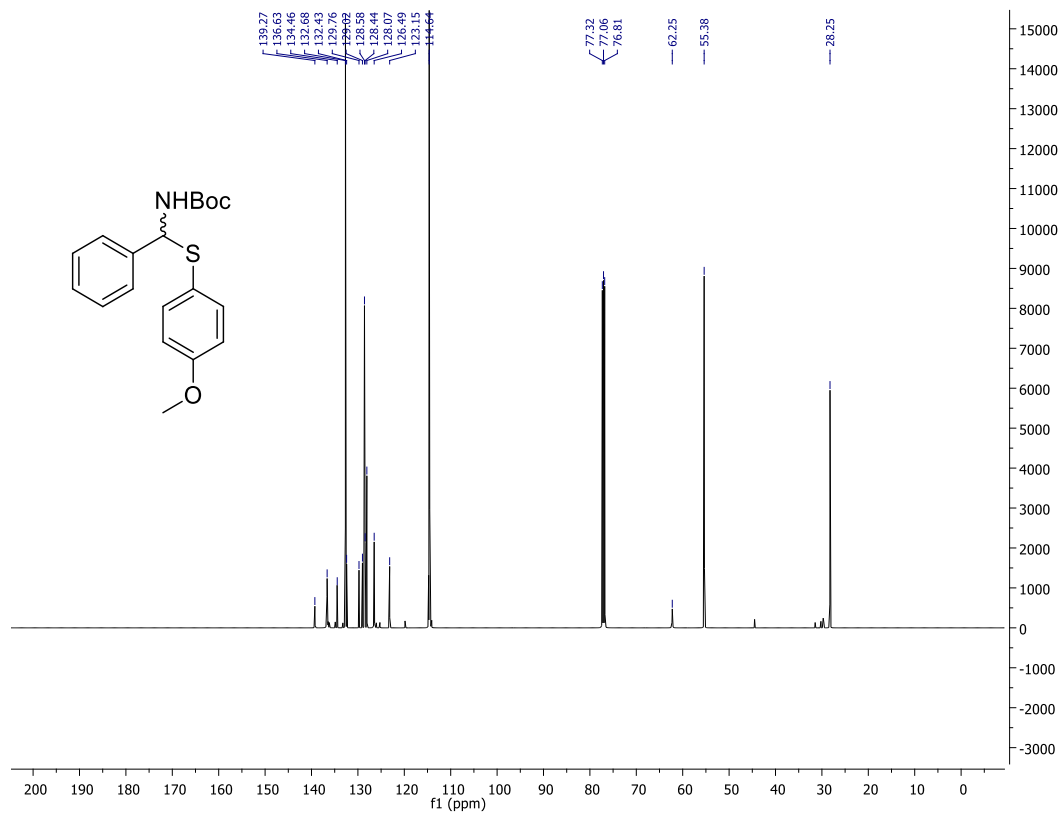


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (((4-metoxifenil)tio)(fenil)metil)carbamato.

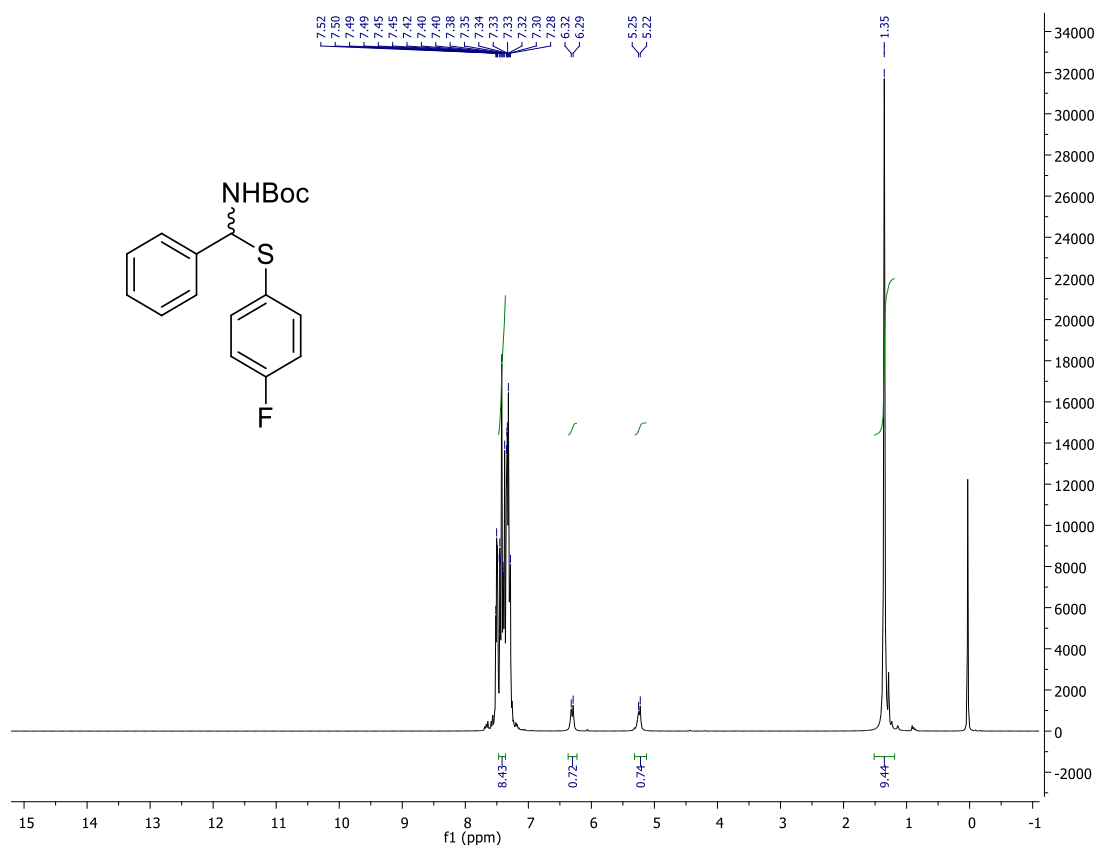


Figura 23. Espectro de RMN de ¹H para o composto *tert*-butil (((4-fluorfenil)tio)(fenil)metil)carbamato.

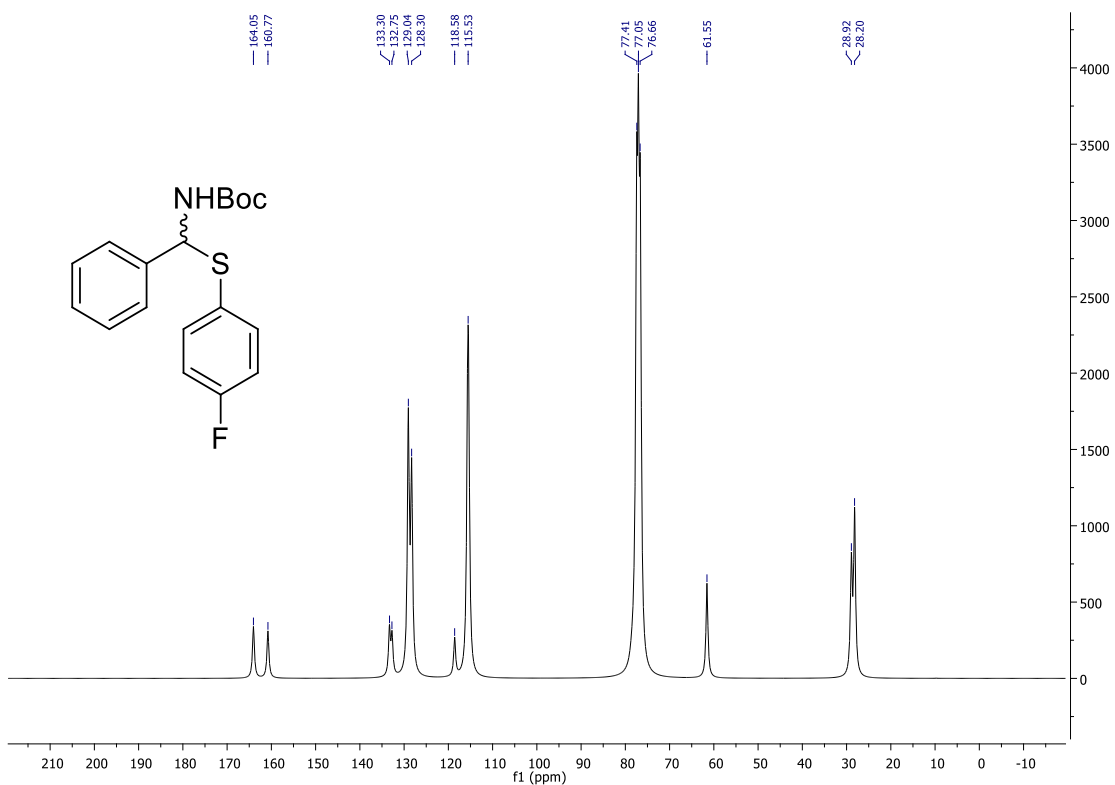


Figura 24. Espectro de RMN de ¹³C para o composto *tert*-butil (((4-fluorfenil)tio)(fenil)metil)carbamato

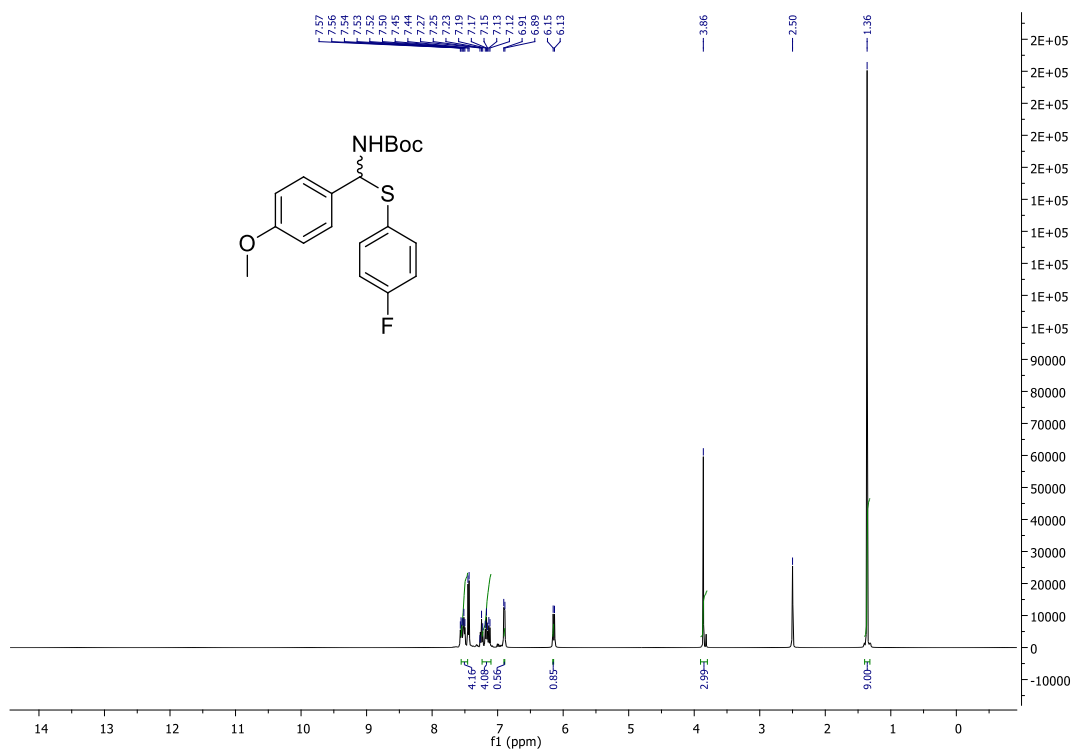


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H para o composto *tert*-butil (((4-fluorfenil)tio)(4-metoxifenil)metil)carbamato.

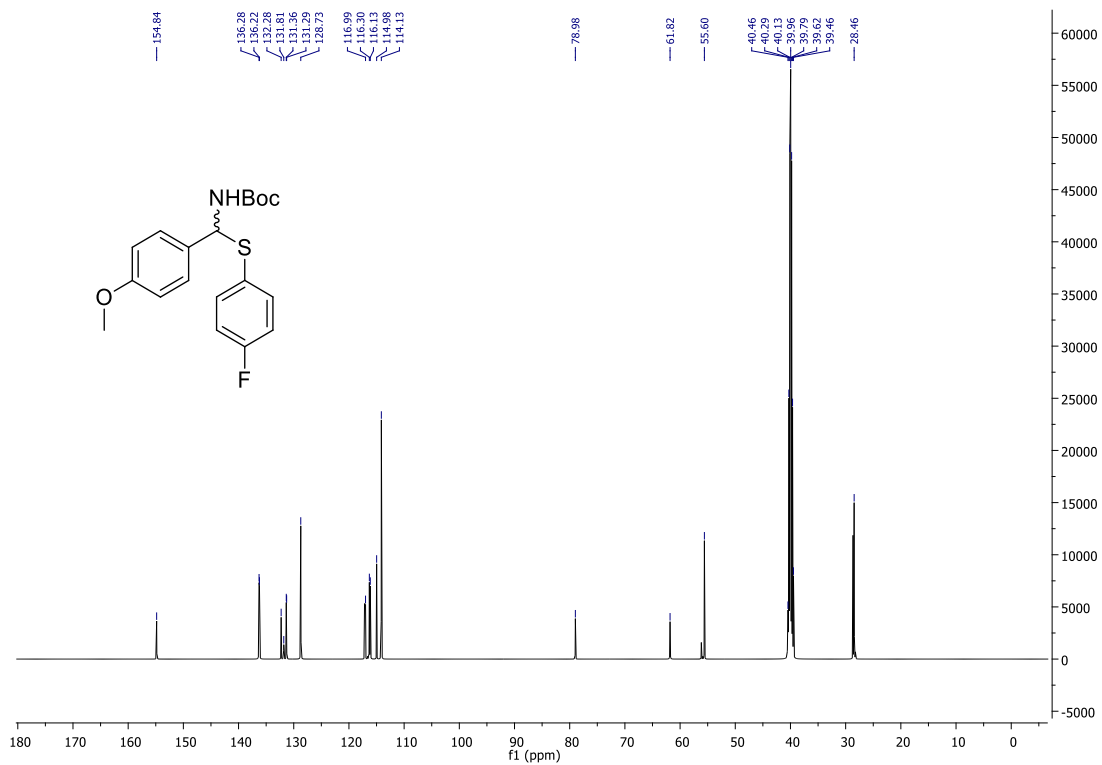


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto *tert*-butil (((4-fluorfenil)tio)(4-metoxifenil)metil)carbamato