


REAÇÕES EM CASCATA ENZIMÁTICA, QUIMIOENZIMÁTICA E FOTOENZIMÁTICA: PERSPECTIVAS PARA UMA SÍNTESE ORGÂNICA MAIS SUSTENTÁVELShirley A. Castilho^a, Humberto M. S. Milagre^a e Cintia D. F. Milagre^{a,*} ^aInstituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 14800-060 Araraquara – SP, Brasil

Recebido em 13/06/2021; aceito em 07/09/2021; publicado na web em 05/10/2021

ENZYMATIC, CHEMOENZYMATIC AND PHOTOENZYMATIC CASCADE REACTIONS: PERSPECTIVES FOR A MORE SUSTAINABLE ORGANIC SYNTHESIS. Chemicals are rarely the result of a single transformation but rather the consequence of several individual reaction steps. Classically, these individual steps are carried out in sequence, including isolation and purification of the intermediate products. However, the reasons for choosing to carry out cascade reactions can be multiple, such as (i) the chance to prepare unstable and/or toxic intermediates, which are consumed directly in a subsequent step, (ii) the option to shift the equilibrium of a reaction by removing the co (product), or (iii) simply bypass the tedious work of isolating and purifying intermediates, saving reagents, solvents, time and money, and still generating less waste. Therefore, it is not surprising that so-called cascade reactions are gaining considerable interest in academic and industrial research. The purpose of this review is to show recent, promising research and new trends, the potential and current limitations of cascade reactions in organic synthesis that involves at least one enzymatic step in the cascade. This review will address cascades involving multi enzymatic, chemoenzymatic, and photoenzymatic cascades, where all steps are performed in one reaction vessel simultaneously or sequentially and the cascades in the regime of continuous flow.

Keywords: cascade reaction; green chemistry; biocatalysis; organic synthesis; sustainable chemistry.

INTRODUÇÃO

A indústria química é considerada “a indústria das indústrias” pois está na base de fornecimento de matérias-primas para todas as outras e, com a crescente demanda por novos produtos e tecnologias a indústria química tornou-se uma das protagonistas no avanço tecnológico. Entretanto, grande parte das metodologias sintéticas em andamento conta com etapas laboratoriais trabalhosas e, por vezes numerosas como por exemplo, as etapas de isolamento e purificação de intermediários, que consomem reagentes, solventes, tempo e recursos financeiros, além de elevar a geração de resíduos.¹ A junção destes aspectos faz com que muitas destas metodologias sejam consideradas problemáticas tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.² Diante desse cenário, a comunidade científica tem se empenhado para o desenvolvimento de metodologias sintéticas mais sustentáveis, contribuindo para uma química mais segura, ambientalmente amigável e economicamente atrativa.³

Dentre estas, as reações em cascata, cuja principal característica é evitar o isolamento dos intermediários de reação resultando em uma consequente minimização das perdas de material, têm se destacado.^{4,5} Além disso, sistemas em cascata podem ser considerados também uma ferramenta oportuna para sínteses que envolvem a formação de intermediários tóxicos ou instáveis, que demandariam de maiores cuidados quanto à prevenção de degradação dos reagentes ou mesmo quanto aos riscos de toxicidade ao operador, pois a sucessividade das transformações químicas promove o consumo imediato de tais intermediários após sua formação. Em casos envolvendo reações reversíveis, este aspecto é bastante útil caso a última reação da cascata seja irreversível. Isso porque, ao ter o produto da reação consumido pela etapa seguinte de transformação, este é retirado do meio promovendo, portanto, o deslocamento do equilíbrio favorecendo a formação do produto desejado.⁶ Tratando-se de ter como princípio o sistema reacional unificado, as reações em cascata têm como maior desafio a otimização de condições reacionais que sejam compatíveis

com todos os componentes envolvidos, indo desde o solvente utilizado, temperatura, pH até a tolerância a possíveis reagentes incompatíveis entre si, mas que sejam fundamentais à reação.⁷

Em sistemas biológicos, como uma célula, várias transformações promovidas por diferentes enzimas ocorrem sucessivamente sob um substrato inicial, podendo dar origem a moléculas polifuncionalizadas complexas.⁸ Inspiradas nestes sistemas, as reações em cascata, devem proporcionar condições para que as múltiplas reações ocorram em um único frasco reacional e, se necessário com compartimentalização, à luz do que acontece em uma célula.⁹ A compartimentalização tem sido uma estratégia útil no caso das cascatas enzimáticas ou quimioenzimáticas, pois reduz a possibilidade de inibição da atividade enzimática devido à presença de intermediários incompatíveis com a estrutura da enzima, ou tóxicos quando são utilizadas células íntegras.¹⁰

Diversas classes de catalisadores podem ser utilizadas nas reações em cascatas, sejam eles catalisadores organometálicos, organocatalisadores, catalisadores metálicos, fotocatalisadores e biocatalisadores ou mesmo uma combinação deles.^{9,11-14} Neste artigo serão abordados diferentes tipos de reações em cascata enzimática. Para fins de clareza, neste trabalho o termo reações em cascata se refere a qualquer sistema reacional onde duas ou mais transformações são realizadas concomitantemente, no mesmo vaso reacional e empregando pelo menos um biocatalisador.^{4,5} Existem inúmeras classificações de cascatas enzimáticas dependendo do parâmetro escolhido, como por exemplo, os tipos de catalisadores envolvidos, o número de etapas reacionais, a cronologia da adição dos catalisadores dentre outros. A seguir serão apresentados alguns tipos mais comuns de classificação de reações em cascata baseadas em seu “*design*”.

CLASSIFICAÇÃO DAS CASCATAS

Cascata linear

Trata-se da mais simples das configurações de reações em cascata e se dá através do emprego de um único substrato para a promoção das transformações mediadas pelos catalisadores. Esse substrato sofre

*e-mail: cintia.milagre@unesp.br

modificações dando origem à espécies intermediárias que serão o substrato das etapas seguintes, levando, por fim, à formação de um único produto final, como está ilustrado na Figura 1.

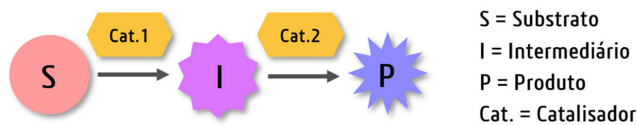


Figura 1. Representação esquemática geral para cascata linear. No caso de reações em cascata dominó, quando o catalisador apresenta múltiplas atividades ou ainda o substrato possui a mesma funcionalidade repetidas vezes é necessário apenas o catalisador 1

Li e colaboradores desenvolveram uma cascata linear e simultânea catalisada por hemoglobina de sangue bovino (HbBv) e lipase de pâncreas suíno (PPL) para a produção de quinoxalinas (Esquema 1).¹⁵ Diferentes quinoxalinas foram obtidas a partir de uma reação tricomponente envolvendo compostos 1,3-dicarbonílicos (**1**), sulfonil azidas (**2**) e 1,2-diaminas (**3**).

Cascata paralela

Diferente da cascata linear, este sistema se dá através da conversão de mais de um substrato em seus respectivos produtos por reações distintas, mas acopladas por alguma etapa, como apresentado na Figura 2. Nesse caso, a obtenção de ambos os produtos é desejável, sendo então uma das cascatas mais atrativas quanto ao aspecto financeiro, visto que pode-se alcançar bons rendimentos para mais de um produto em um único procedimento.

Rioz-Martínez e colaboradores desenvolveram uma metodologia de cascata paralela em que uma oxidação catalisada por uma

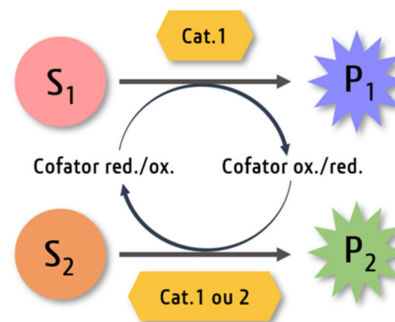
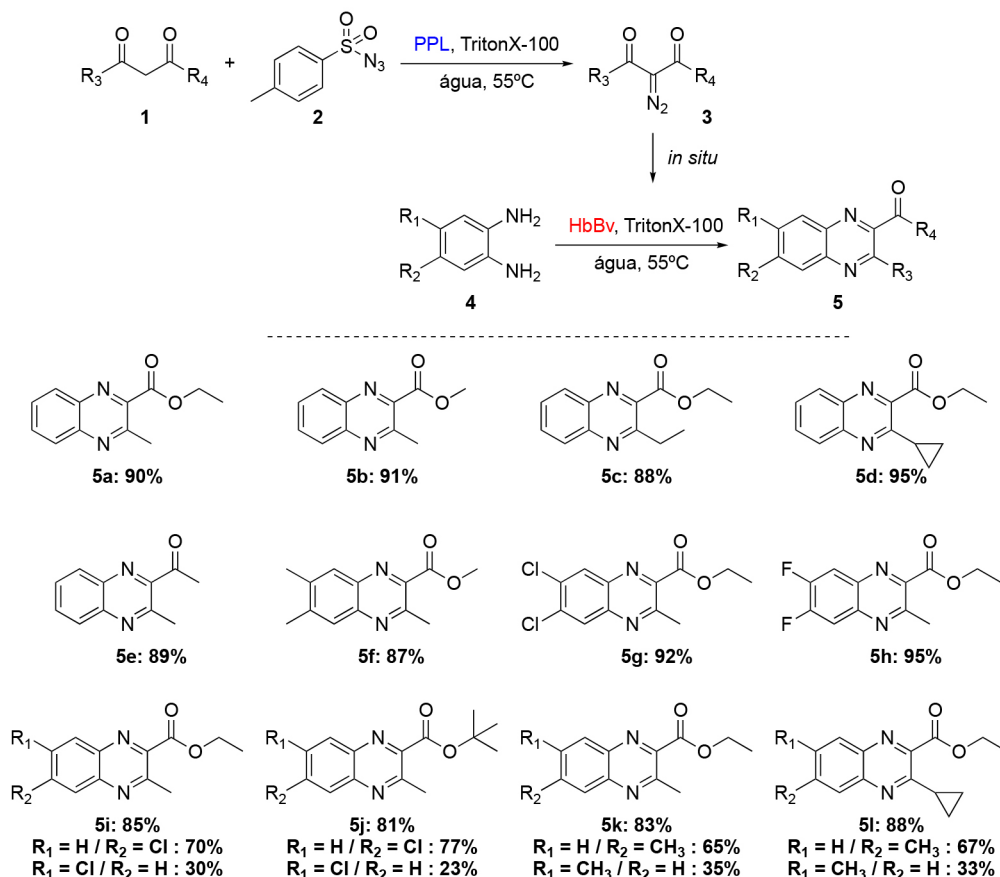


Figura 2. Representação esquemática geral para cascata paralela

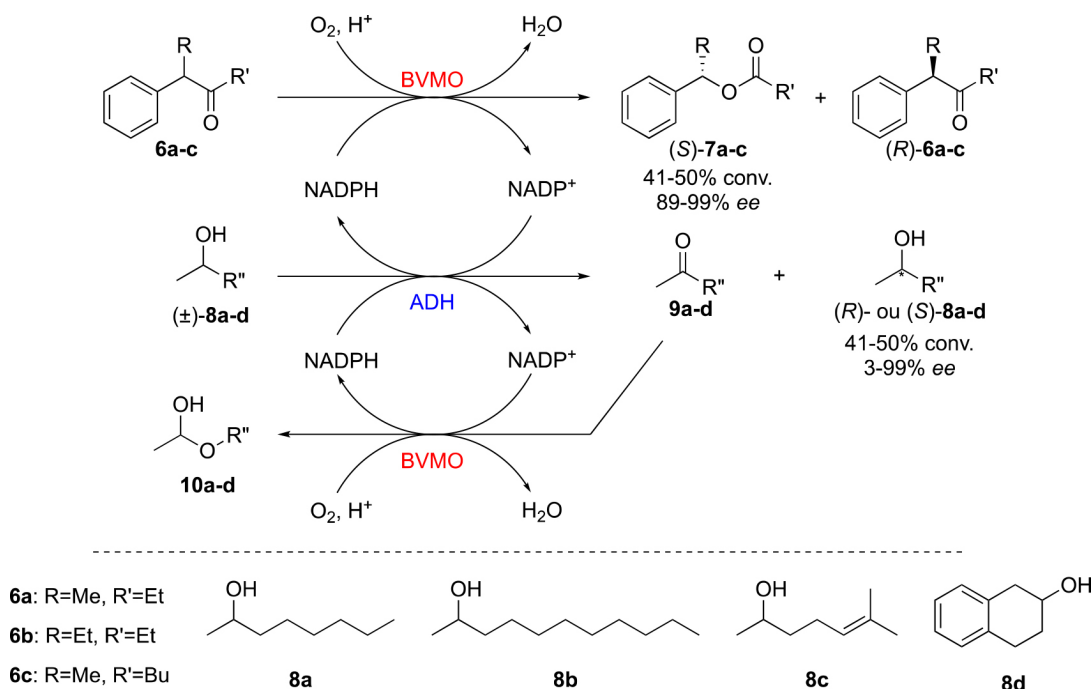
enzima do tipo Bayer-Villiger monooxigenase (BVMO) ocorre paralelamente à uma resolução cinética catalisada por uma enzima álcool desidrogenase (ADH). Conectadas pela regeneração do cofator NADPH/NADP⁺, as reações permitiram a obtenção satisfatória de cetonas e álcoois enantiomericamente enriquecidos (Esquema 2).¹⁶ Variantes desta cascata puderam levar à formação de sulfóxidos enantiomericamente enriquecidos.¹⁶

Cascata ortogonal

Similarmente à cascata paralela, trata-se de um sistema onde pelo menos duas transformações de compostos distintos ocorrem de maneira acoplada (Figura 3). Contudo, nesse caso a reação lateral ocorre somente como auxiliadora na promoção da transformação principal. Exemplos clássicos de cascatas ortogonais são dados através da utilização de enzimas que demandam de co-substratos (como moléculas doadoras de grupos funcionais) ou dependentes de cofatores que são regenerados por uma segunda enzima.



Esquema 1. Cascata linear e simultânea para a formação de quinoxalinas a partir de compostos 1,3-dicarbonílicos, sulfonil azidas e 1,2-diaminas



Esquema 2. Cascata paralela utilizando BVMO e ADH para a obtenção de cetonas e álcoois enantiomericamente enriquecidos

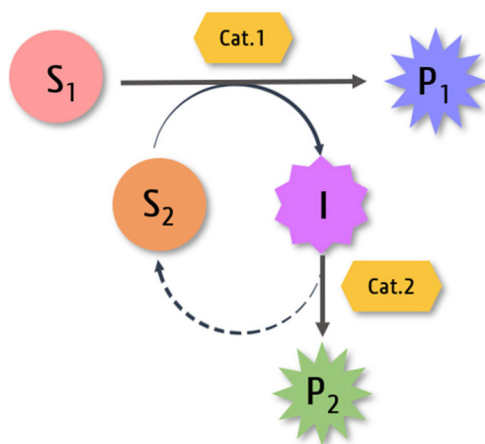


Figura 3. Representação esquemática geral para cascata ortogonal

Brenna e colaboradores desenvolveram uma metodologia para a obtenção dos quatro estereoisômeros do 4-metil-heptan-3-ol, por meio de uma cascata sequencial constituída de cascatas ortogonais em cada etapa (Esquema 3).¹⁷ O acesso ao primeiro centro estereogênico ocorreu através da redução do substrato por uma eneredutase (ER), cuja reação é dependente do NADPH como cofator. Esse, por sua vez, foi regenerado pela utilização de glicose e da enzima glicose desidrogenase (GDH), gerando a primeira cascata ortogonal. Para a obtenção do centro estereogênico subsequente foi adicionado ao sistema um segundo catalisador para a reação de redução, a enzima álcool desidrogenase (ADH), cuja atividade também é dependente da presença de NADPH. Da mesma forma, a regeneração do cofator foi realizada pela presença de GDH e glicose.

Cascata cíclica

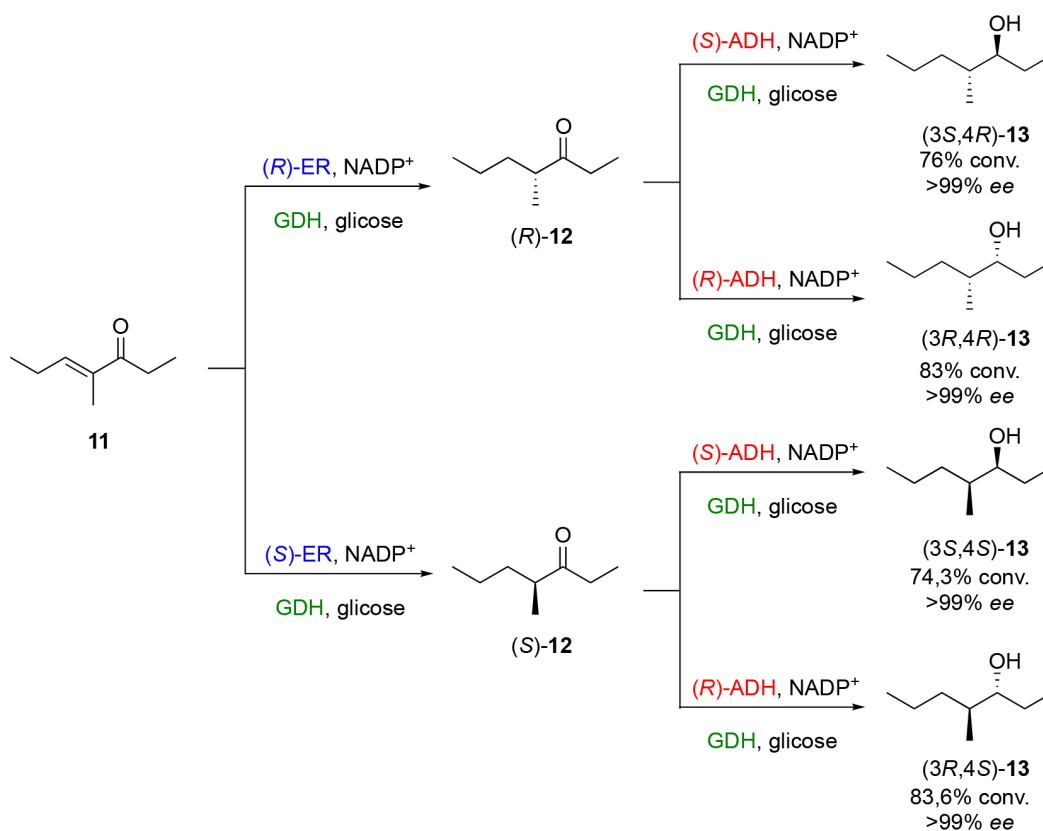
Refere-se à sistemas em que, a partir de uma mistura de dois substratos, ocorre a conversão seletiva de um destes ao seu respectivo intermediário, que então é transformado novamente na mistura dos materiais de partida (Figura 4). Assim, há um aumento na concentração do produto podendo alcançar conversões quantitativas.

Desta forma, Sehl e colaboradores desenvolveram um sistema em cascata cíclica para a obtenção da (1*R*-2*S*)-norefedrina e (1*R*,2*R*)-norpseudoefedrina, ambos enantiomericamente puros (Esquema 4). Na primeira etapa ocorreu a descarboxilação do piruvato (**15**) catalisada por uma liase (AHAS-I) e o acetaldeído recém gerado sofreu uma condensação aldólica com o benzaldeído (**14**) formando o intermediário (*R*)-fenilacetilcarbinol (**16**) que não foi isolado e serviu como material de partida para a enzima ω-transaminase (*R*) ou (*S*) seletiva catalisar a reação de aminação reductiva e consequente formação de (**18**). Neste caso, a escolha perspicaz da alanina (**17**) como doador de grupo amino permitiu que o subproduto da aminação reductiva fosse o piruvato (**15**), reciclando assim este reagente utilizado na primeira etapa da cascata.¹⁸

Outros tipos de classificações de cascatas

Um equívoco comum quando se trata de reações em cascata, é acreditar que o número de etapas é determinado pelo número de catalisadores envolvidos. Um dos aspectos de classificação destes sistemas pode, sim, ser o número de catalisadores presentes, mas não somente ele, visto que existem também cascatas com múltiplas etapas em que somente um catalisador é utilizado. Um exemplo claro disso são as reações dominó, em que a presença de um único catalisador ocasiona a geração de um produto cuja instabilidade (como um radical, por exemplo) leve ao desencadeamento de transformações espontâneas, gerando por fim um produto estável (Figura 5).

Outro exemplo de sistemas que utilizam apenas um catalisador são as cascatas desenvolvidas com o emprego de uma enzima com promiscuidade catalítica, assim denominada por ser capaz de promover mais de um tipo de transformação e atuando seguidamente sob grupos funcionais distintos (Figura 6a).¹⁹ Por fim, ainda com o emprego de um único catalisador, existem também casos em que uma enzima não promíscua, isto é, que promove somente um tipo de transformação, depara-se com um substrato que contém em sua estrutura o mesmo grupo funcional repetidas vezes (Figura 6b). Assim, ela pode atuar diversas vezes em uma mesma molécula, promovendo reações idênticas em cada grupo de maneira sucessiva. Com exceção destas categorias, todos os demais tipos de cascatas



Esquema 3. Cascata ortogonal para a obtenção dos quatro estereoisômeros do 4-metil-heptan-3-ol a partir de **11** catalisada pelas enzimas ER, ADH e GDH

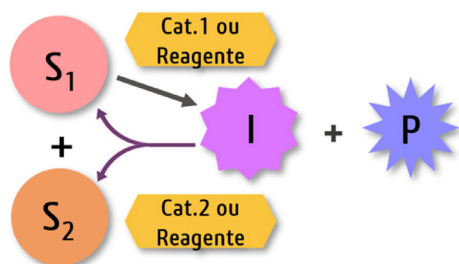


Figura 4. Representação esquemática geral para cascatas cíclicas

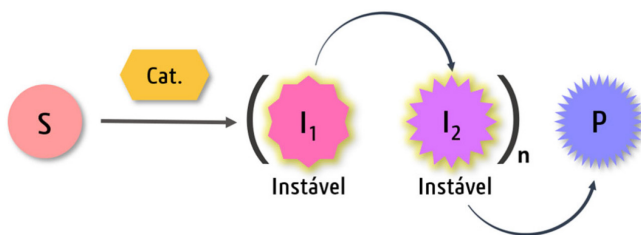
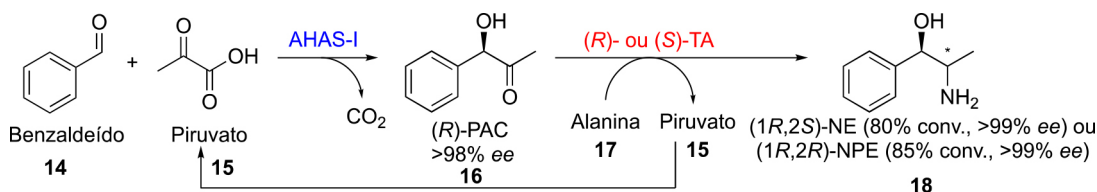


Figura 5. Representação esquemática geral para uma reação dominó

dependem do emprego de mais de um catalisador.

Um exemplo de cascata utilizando apenas um biocatalisador pode ser observada no trabalho de Fu e colaboradores, em que derivados



Esquema 4. Cascata cíclica para a obtenção de (1R,2S)-norefedrina e (1R,2R)-norpseudoefedrina a partir de benzaldeído e piruvato utilizando as enzimas AHAS-I, ADH e TA

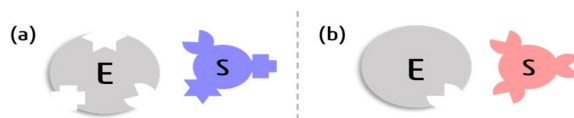
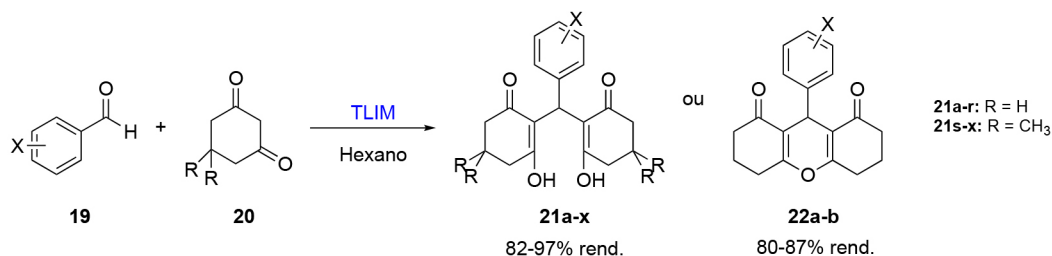


Figura 6. Reações em cascata promovidas por apenas um catalisador: (a) uso de enzima promíscua em um substrato com diferentes grupos funcionais e (b) uso de enzima não promíscua em um substrato com repetição de grupos funcionais

de xantona (**21** e **22**) foram obtidos através de uma condensação de Knoevenagel e adição de Michael, ambas catalisadas por lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada (TLIM), conforme apresentado no Esquema 5.²⁰

Quando se emprega mais de um catalisador, outro fator de classificação de reações em cascatas é a cronologia em que os reagentes são adicionados ao meio reacional e, conseqüentemente as reações são promovidas. Pode-se dizer que reações em cascata simultânea (Figura 7a) são consideradas mais sofisticadas, visto que as transformações se processam com a adição de todos os reagentes ao mesmo tempo. Contudo, nem todas as reações podem se adequar a esse tipo de sistema porque, para isto, os componentes reacionais devem ser integralmente compatíveis. Um dos obstáculos é a competitividade entre as reações, tornando um catalisador inativo frente ao intermediário já transformado anteriormente pelo primeiro



Esquema 5. Síntese de derivados de xantona (**21** e **22**) em cascata a partir de reações (**19**) e (**20**) catalisadas por um único catalisador, a enzima TLIM

catalisador. Esse efeito pode ser observado especialmente quanto à utilização de enzimas com especificidade de substratos reduzida, que acabam por ter sua atividade enzimática diminuída ou mesmo completamente suprimida pela presença de grupos funcionais adjacentes próximos à região de transformação do substrato, seja por efeitos estéricos ou eletrônicos. Em cascatas quimioenzimáticas, o efeito de supressão catalítica pode ser observado também através da própria presença do catalisador químico ao meio em que a enzima está contida, podendo provocar a desnaturação da estrutura enzimática.

Em caso de incompatibilidade, uma alternativa viável é a adequação dos parâmetros para utilização de uma reação em cascata sequencial em que o catalisador da segunda reação (acompanhado, se necessário, de seus respectivos co-reagentes) é adicionado ao mesmo frasco reacional após a completude da primeira transformação (Figura 7b).

resultados promissores em termos de redução da geração de resíduos devido à potencial quimio-, regio- e enantiosseletividade das enzimas.^{21,22} Com isso, além de evitar etapas de derivatização ou a obtenção de subprodutos indesejados, o requerimento de condições reacionais mais brandas e uso de reagentes e solventes menos tóxicos torna a biocatálise uma ferramenta útil também para a possível redução de custos e esforços operacionais em comparação a outras metodologias.²³ A seguir serão discutidos exemplos de cascatas quimioenzimáticas, bi- ou multienzimáticas e ainda fotoenzimáticas para a obtenção de diferentes compostos de interesse comercial. Todos esses sistemas possuem a vantagem de aliar os benefícios da biocatálise e das reações em cascata, proporcionando o acesso a moléculas de maior complexidade em um sistema unificado e com menor possibilidade de ocorrência de reações laterais.

CASCATA QUIMIOENZIMÁTICA

Como o próprio nome diz, nestes tipos de cascatas há a participação tanto de catalisadores químicos quanto enzimáticos. A obtenção de 1,3-dióis quirais vem sendo cada vez mais aprimorada devido à alta demanda como bloco construtor quiral para a síntese de compostos biologicamente ativos. Contudo, por possuir dois centros estereogênicos, sua obtenção tem como desafio a limitada estereosseletividade das metodologias mais tradicionais.²⁴ Buscando contornar este problema, Baer e colaboradores desenvolveram uma cascata quimioenzimática sequencial capaz de permitir acesso aos quatro estereoisômeros dos 1,3-dióis (**26**) a partir do *p*-clorobenzaldeído (**23**) e a propanona (**24**) (Esquema 6). Ao contrário das metodologias mais comuns para a obtenção de álcoois opticamente ativos que ocorrem por meio da redução enantiosseletiva de cetonas pró-quirais, nesse método foi realizada uma condensação

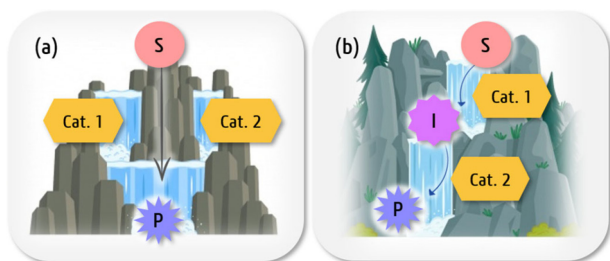
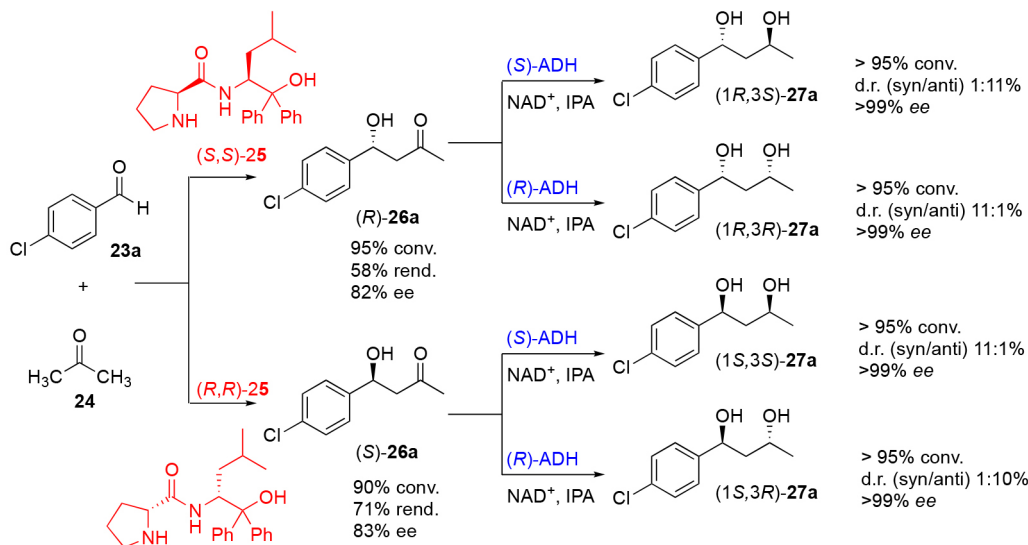


Figura 7. Representação do esquema geral de uma cascata (A) simultânea e (B) sequencial

Do ponto de vista da química verde, o emprego de biocatalisadores em suas diferentes formas - enzimas ou células íntegras, imobilizados ou não, selvagens ou modificados geneticamente - tem fornecido



Esquema 6. Cascata quimioenzimática utilizando um organocatalisador (**25**) e enzimas (ADH) para obtenção de 1,3-dióis quirais

aldólica assimétrica promovida pelos organocatalisadores peptídicos (**25**) seguida do emprego de enzimas álcool desidrogenases (ADH).²⁵

Como estratégia de desenvolvimento deste trabalho, os autores investigaram a segunda etapa da reação em cascata, a fim de avaliar a atividade enzimática de duas ADH (*R*) e (*S*) específicas utilizando o intermediário racêmico β-hidroxicetona (**26a**) como substrato. O objetivo deste estudo foi investigar a tolerância de cada enzima às duas formas enantioméricas bem como a influência da presença de um centro assimétrico. Como resposta ao emprego da (*S*)-ADH foi demonstrada a efetividade desta enzima para a redução quantitativa do grupo cetona de **26a** em sua forma racêmica, demonstrando que, além de admitir os dois enantiômeros como substrato, a atividade enzimática não foi afetada pela presença do centro assimétrico já que os estereoisômeros foram obtidos em suas formas enantiomericamente puras (*ee* > 99%). O mesmo comportamento foi observado para a (*R*)-ADH. Com a segunda etapa da reação em cascata bem definida, os pesquisadores se voltaram então para a otimização da primeira etapa responsável pela formação dos produtos aldol quirais ((*R*)-**26a**) e ((*S*)-**26a**) enantiomericamente puros, em uma síntese sem solventes. Utilizando os organocatalisadores (**25**) com configuração (*S,S*) e (*R,R*), à temperatura ambiente, foi possível obter as β-hidroxicetonas ((*S*)-**26a**) e ((*R*)-**26a**) com conversões de 90 e 95% e *ee* de 83 e 82%, respectivamente. Uma vez constatada a viabilidade de cada um dos catalisadores para o acesso aos quatro enantiômeros separadamente, partiu-se para a investigação de compatibilidade entre o organocatalisador (**25**) e as enzimas ADH, cujos resultados permitiram à conclusão de que a atividade das enzimas não foi afetada consideravelmente pela presença do organocatalisador (Esquema 7). Assim, o estereoisômero de interesse (1*R*,3*S*)-**27a** foi sintetizado por meio de uma cascata quimioenzimática com uma conversão global de 95% e com *ee* > 99%.

CASCATAS BI- OU MULTIENZIMÁTICAS

Nesses casos, todas as etapas das cascatas utilizam biocatalisadores. A seguir serão apresentados três exemplos, cada um focando na síntese de produtos com aplicações distintas e classes enzimáticas diferentes, a fim de ilustrar a abrangência deste tipo de cascata.

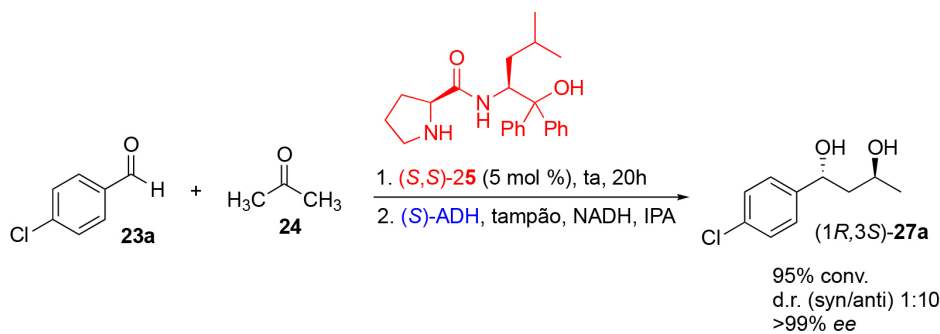
O primeiro exemplo envolve a formação de β-haloidrinas. As transformações em grupos funcionais de β-haloidrinas são conhecidas por permitir a obtenção de aminoalcoois, hidroxinitrilas e dióis,

que por sua vez são substratos úteis para a síntese de compostos de interesse comercial, como agroquímicos, compostos farmacêuticos e produtos naturais, dentre outros.²⁶ Diversas metodologias para a obtenção de β-haloidrinas já foram descritas contando, contudo, com aspectos desafiadores quanto aos rendimentos.²⁷⁻³¹ Cui e colaboradores desenvolveram uma reação em cascata para a obtenção de β-haloidrinas (**29a**) a partir de β-haloalcanos (**28a**), utilizando uma enzima tipo monooxigenases do citocromo P450 e uma enzima do tipo halohidrinases desidrogenases (HHDH). As enzimas monooxigenases P450 são capazes catalisar a inserção de um átomo de oxigênio em ligações C-H não ativadas sob condições reacionais mais brandas enquanto as enzimas haloidrinas desidrogenases são responsáveis por catalisar a desalogenação de halohidrinases. A combinação destas duas enzimas resultou na formação dos correspondentes β-haloidrina (**29**) e epóxido (**30**) a partir do haloalcano (**28**) (Esquema 8).³²⁻³⁶ Aqui, a enzima HHDH altamente enantiosseletiva foi fundamental para melhorar os valores de excessos enantioméricos obtidos na transformação anterior, promovida pelas P450.³⁷

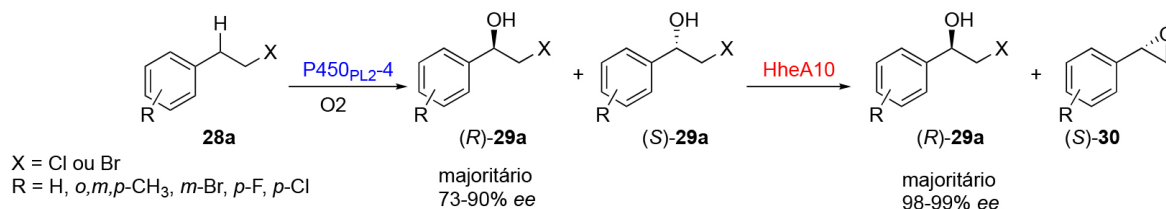
A enzima monooxigenase P450 proveniente da cepa *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1 foi previamente otimizada através de técnicas de biologia molecular que levaram à expressão do gene correspondente às P450s e seus respectivos auxiliares redox (ferrodoxina / ferrodoxina redutase – Fdx/Fdr).^{38,39} Inicialmente, buscando avaliar a atividade e estereosseletividade das P450s expressas em *E. coli.*, o substrato 2-cloroetilbenzeno foi utilizado como substrato padrão, sem a adição de nenhum cofator exógeno, sendo os micro-organismos incubados à 30 °C por 24 h.

Todas as cepas contendo P450_{PL2} ou P450_{PL7} analisadas apresentaram atividades frente a este substrato produzindo o enantiômero *R* com rendimentos de 17-49%, além de uma estereosseletividade considerável, alcançando até 77%. Uma vez estabelecidas as melhores condições reacionais, a reatividade enzimática foi avaliada para clorohidrocarbonetos ou bromohidrocarbonetos (**28a**) *orto*-, *meta*- e *para*-substituídos com grupos CH₃, F, Br ou Cl. As *R*-haloidrinas foram obtidas com rendimentos de 16-81% e *ee* de 80-99%, cujos resultados mostram a influência dos efeitos estereoeletrônicos provocados pelo padrão de substituição no anel aromático e do tipo de átomo de halogênio. As cloroidrinas foram obtidas em maiores rendimentos que as bromoidrinas.

A segunda etapa desse trabalho consistiu na otimização dos excessos enantioméricos obtidos pela primeira transformação,



Esquema 7. Cascata quimioenzimática utilizando o organocatalisador ((*S,S*)-**25**) e a enzimas (*S*)-ADH para a obtenção do 1,3-diol (1*R*,3*S*)-**27a**



Esquema 8. Cascata bienzimática para a síntese de β-haloidrinas com a utilização das enzimas monooxigenases P450 e HHDH

promovida pela P450_{PL2-4}, através do consumo do enantiômero indesejado. Assim, utilizou-se uma HHDH de *Tsukamurella* sp. 1534 previamente expressa e caracterizada pelos pesquisadores (HheA10), que frente a β -haloidrinas demonstrou ter enantiosseletividade *S*.³³ Tendo como objetivo evitar uma possível desalogenação excessiva promovida pela HheA10, desenvolveu-se uma cascata sequencial bienzimática utilizando P450_{PL2-4} e HheA10 para obtenção de (*R*)-**29a**, com a adição do extrato livre de células contendo HheA10 após 8 h do início da adição do primeiro biocatalisador, a enzima P450_{PL2-4}. A presença da HheA10 provocou uma ligeira diminuição nos valores de rendimentos obtidos pela P450_{PL2-4} quando sozinha. Contudo, como esperado, os valores de *ee* para os produtos foram otimizados, garantido excessos enantioméricos de 99% para quase todos os substratos avaliados.

Outro exemplo de uso de reações em cascatas bienzimáticas é na síntese de polímeros que podem ser utilizados em cristais fotônicos. A obtenção de polímeros multiblocos e polímeros de pesos moleculares ultra altos (UHMW) bem definidos tem sido um desafio devido ao aumento da possibilidade de etapas de terminações diferentes após tempos de reação elevados ou múltiplas etapas de iniciação.⁴⁰⁻⁴² Buscando aprimorar os processos de obtenção destes materiais, as polimerizações radiculares de desativação reversível (RDRP) alcançaram bons resultados, promovendo uma diminuição na concentração de radicais ativos e, conseqüentemente, mantendo uma elevada taxa de polimerização.^{43,44} Contudo, apesar dos resultados promissores, as técnicas RDRPs costumam ser bastante sensíveis à presença de oxigênio, o que faz com que este tipo de síntese demande de condições com rigorosa ausência de oxigênio.⁴⁵

Como uma alternativa a tais condições, Liu e colaboradores desenvolveram uma cascata enzimática utilizando desoxigenação catalisada pela enzima P2Ox e a etapa de iniciação catalisada por enzimas peroxidase de rábano (HRP).⁴⁶ Tal método visou a síntese de polímeros multiblocos e de pesos moleculares ultra altos por transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT), em condições moderadas e tolerantes à presença de oxigênio, tornando este processo mais sustentável em relação às metodologias descritas anteriormente.⁴⁷ Essa metodologia se baseia na estratégia de utilização da enzima P2Ox para a redução do oxigênio com D-glicose produzindo peróxido (H₂O₂) *in situ* que é utilizado pela enzima HRP para a geração dos radicais acetilacetona (ACAC), dando início à polimerização RAFT, como ilustrado no Esquema 9.^{48,49}

Estudos cinéticos indicaram uma linearidade no fluxo de radicais, sugerindo a efetividade da desoxigenação promovida pela enzima P2Ox. Confirmando esta hipótese, ao avaliar os polímeros obtidos observou-se uma estrutura polimérica simétrica independente do tempo reacional, sugerindo que a terminação precoce por oxigênio era de fato desprezível e que a reação prosseguiu de maneira controlada.

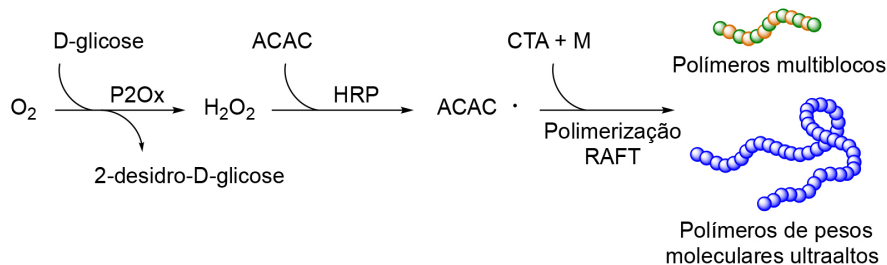
Posteriormente, os compostos *N,N*-dimetilacrilamida (DMA), acrilato metil éter poli(etilenoglicol) (PEGA) e metacrilato de metil éter poli(etileno glicol) (PEGMA) foram utilizados como três diferentes monômeros para a obtenção de polímeros com diferentes graus de polimerização. Os resultados obtidos demonstram

a efetividade da utilização da cascata bienzimática P2Ox-HRP na obtenção desses homopolímeros. Em seguida, foi proposta a síntese de polímeros multiblocos através da adição sequencial dos diferentes monômeros. Nesse procedimento, para que a capacidade de desoxigenação permanecesse constante, assim como a geração de radicais, foi necessária a adição dos compostos ACAC e glicose junto aos monômeros em cada ciclo. Para isso, foram utilizadas duas acrilamidas, DMA e 4-acriiloilmorfolina (AML), iniciando o processo pela obtenção de uma unidade polimérica com DP de cerca de 100-150, seguida de unidades poliméricas com DP de cerca de 50 para cada bloco subsequente. Através dessa estratégia, foi possível obter 4 polímeros multibloco com conversões acima de 96%, todos com elevados pesos moleculares e distribuições simétricas, apesar do aumento gradual da dispersidade com o aumento dos multiblocos.

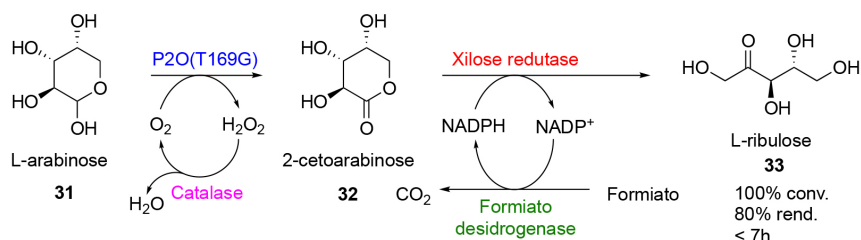
Nesse processo, constatou-se que apesar da notável tolerância à presença de oxigênio demonstrada por este sistema enzimático é desejável que a reação seja realizada em recipiente fechado a fim de manter a concentração de radicais à um baixo nível e, conseqüentemente, obter melhores resultados na síntese de polímeros de pesos moleculares ultraaltos (UHMW). Apesar disso, mesmo em recipiente fechado sem desgaseificação foi possível obter uma conversão de 93% na obtenção de um produto com DP alvo de 10.000. Outros polímeros com DP mais elevados (20.000 e 30.000) foram obtidos de forma semelhante, com conversões acima de 90%. Assim, é possível constatar a efetividade da utilização do sistema em cascata bienzimática sequencial P2Ox-HRP na síntese de polímeros bem definidos e com elevados pesos moleculares, sejam eles sob forma de homopolímeros ou copolímeros. Além disso, sua tolerância a presença de oxigênio destaca-se por demandar de menor esforço operacional, além das condições reacionais brandas, tornando essa metodologia uma estratégia sustentável na obtenção destes produtos.

As cascatas enzimáticas também são uma importante estratégia sintética para o aproveitamento de biomassa como fonte de matéria-prima. Baseando-se na demanda pela produção de açúcares de difícil obtenção, protocolos de transformação enzimáticos vêm se apresentando como propostas viáveis, devido principalmente ao potencial regio- e enantiosseletivo das enzimas, neste caso, tendo um interesse especial em sua atuação sob as funções álcoois e aldeídos, já que esses grupos funcionais são bastante comuns nas estruturas de açúcares.^{50,51} A L-ribulose, por exemplo, pode ser destacada como um produto de interesse particular, já que pode ser utilizada como precursora na obtenção de análogos de L-nucleosídeos que, por sua vez, são precursores para compostos empregados no tratamento de câncer e infecções virais.⁵²

Diferentes metodologias já foram descritas na literatura para a obtenção da L-ribulose, inclusive a partir da utilização de enzimas. Apesar disso, a maioria destas metodologias ainda conta com desafios como o emprego de muitas etapas laboratoriais ou o alto custo de alguns reagentes envolvidos no processo.⁵³ Assim, Chuaboon e colaboradores propuseram uma nova metodologia para a obtenção deste produto através de um processo multienzimático em duas etapas: uma oxidação na posição C2 da L-arabinose (**31**) dando origem à



Esquema 9. Esquema geral do sistema em cascata bienzimática utilizando as enzimas P2Ox e HRP para catalisar reações de polimerização radiculares



Esquema 10. Cascata multienzimática desenvolvida para a síntese de L-ribulose a partir de L-arabinose

2-cetoarabinose (**32**) seguida de uma redução em C1 para formar a L-ribulose (**33**) (Esquema 10).⁵⁴

Para a etapa de oxidação, a piranose-2-oxidase (P2O) foi adotada como enzima potencialmente viável, visto que dados disponíveis na literatura sobre um tipo selvagem de P2O relatam transformações eficientes em hexoses como a D-glicose.⁴³ Dessa forma, a enzima P2O foi modificada geneticamente visando melhorar sua atividade frente à L-arabinose, gerando uma gama de P2O mutantes, cujas atividades foram investigadas, resultando na seleção da variante P2O (T169G) como sendo a mais ativa entre as obtidas. Os resultados sugerem que a oxidação promovida pela P2O (T169G) é dada em uma etapa única, com taxa de conversão da L-arabinose em 2-cetoarabinose 40 vezes superior quando comparada com a reação catalisada pela P2O selvagem, além de uma eficiência catalítica 13 vezes maior, em menor tempo reacional.⁵⁵

Após os resultados promissores para a obtenção da 2-cetoarabinose (**32**) promovida pela P2O (T169G), a etapa seguinte envolveu a redução em C1 para a formação da L-ribulose (**33**). Para isso, selecionou-se como segundo biocatalizador a xilose redutase de *Hypocrea jecorina*, cuja atividade é dependente da presença do cofator NADPH.⁵⁶ Assim, a fim de garantir a disponibilidade do cofator em sua forma reduzida para manter a atividade enzimática, a redução de **32** foi acoplada a uma terceira enzima, a formiato desidrogenase. Baseando-se ainda na demanda de uma concentração constante de oxigênio para a plena atividade da P2O (T169G), uma quarta enzima, a catalase, também foi acoplada ao sistema visando a remoção do subproduto H₂O₂ gerado pela transformação da primeira etapa.

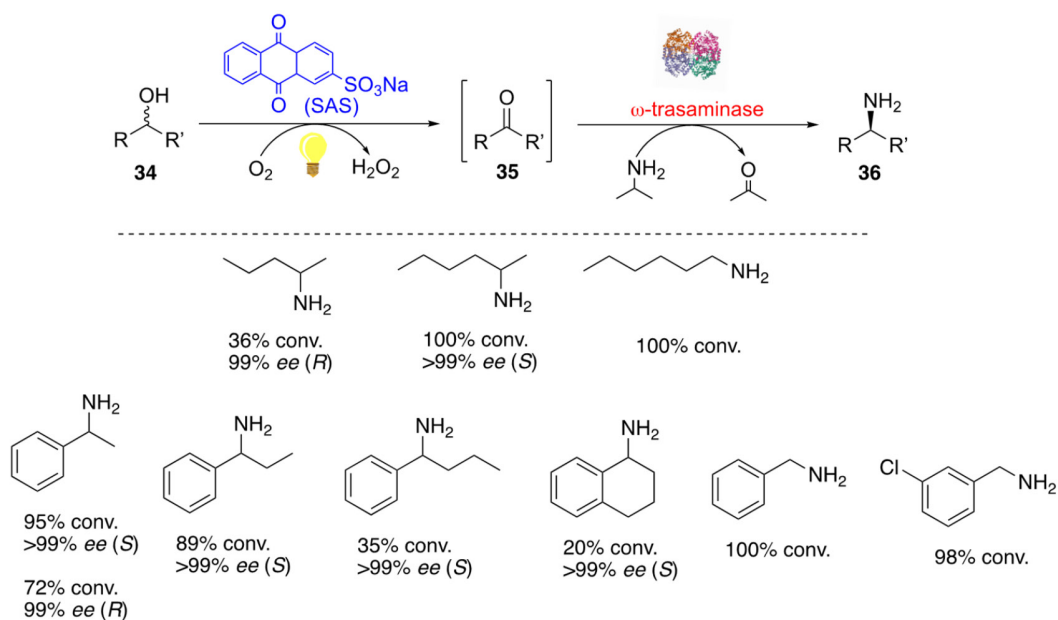
Dessa forma, desenvolveu-se uma cascata multienzimática empregando quatro enzimas simultaneamente. Utilizando este

sistema foi possível, em menos de 7h reacionais, obter a L-ribulose com 100% de conversão e cerca de 80% de rendimento. Diante dos resultados que apontam um rendimento elevado em comparação à outras metodologias, atuação em condições reacionais brandas e sem a formação de subprodutos fica constatada a eficiência desse sistema para a obtenção da L-ribulose.

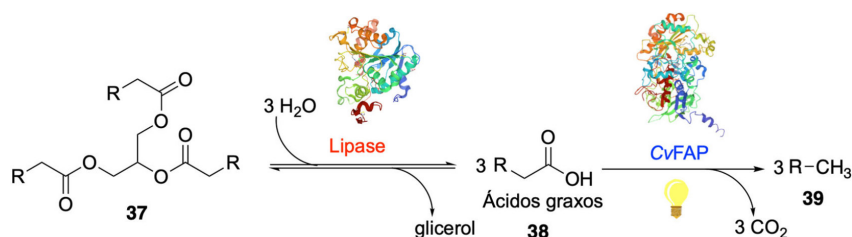
CASCATAS FOTOENZIMÁTICAS

No campo da química verde, as reações fotocatalisadas tem recebido uma atenção particular e a implementação da luz para dirigir reações de cascatas enzimáticas e quimioenzimáticas abrem uma janela de possibilidades para a química sustentável. Entretanto, existem alguns obstáculos a serem superados nestas aplicações, principalmente a incompatibilidade entre o biocatalisador e o fotocatalisador.⁵⁷ Visando mostrar o potencial de abrangência de reações em cascatas catalisadas fotoenzimaticamente, abordaremos a seguir dois exemplos, uma cascata quimioenzimática e uma cascata totalmente enzimática.

Gacs e colaboradores desenvolveram uma cascata fotoquimioenzimática para a síntese de aminas enantiomericamente puras (**36**) a partir de álcoois racêmicos (**34**), como apresentado no Esquema 11.⁵⁸ Nessa síntese foram empregadas duas abordagens de cascata *one-pot*, uma simultânea e a outra sequencial, combinando uma reação de oxidação de álcoois mediada por luz e uma aminação reductiva biocatalítica. Para a etapa de oxidação foram triados vários fotocatalisadores e o organofotocatalisador SAS (do inglês, *Sodium Anthraquinone Sulfate*) foi selecionado para a conversão de rac-1-feniletanol em acetofenona. Para a reação de aminação reductiva foram selecionadas duas enzimas do tipo ω-transaminase, sendo uma (*R*)



Esquema 11. Cascata sequencial para a síntese de aminas enantiomericamente puras



Esquema 12. Cascata fotoenzimática utilizando lipase e CvFAP para a obtenção de alcanos a partir de lipídeos

seletiva isolada de *Aspergillus terreus* (AT ω TA) e a outra (S) seletiva isolada de *Bacillus megaterium* (BM ω TA).

A reação em cascata *one-pot* simultânea ocorreu de maneira bem-sucedida, porém apresentou algumas limitações como: 1) inativação e degradação do biocatalisador pelo SAS fotoexcitado; 2) a reação de oxidação catalisada por SAS foi muito lenta. A fim de contornar essas limitações, foi estabelecido um procedimento em cascata *one-pot* sequencial em que primeiramente foi realizada a reação fotoquímica, seguida da adição do biocatalisador para a reação de aminação redutiva. Com esta abordagem foram obtidos excelentes resultados utilizando as duas ω -trasmínases obtendo as aminas enantiomericamente puras com 95% de conversão para a AT ω TA e 98% de conversão para a BM ω TA. De modo a expandir o escopo desta cascata sequencial, substratos alifáticos, aromáticos, quirais e não quirais foram investigados. Apesar dos bons rendimentos obtidos com alguns dos substratos aromáticos (> 80%), foi observada uma diminuição do rendimento ao se aumentar o comprimento da cadeia lateral alifática nestes substratos. Embora essa reação em cascata seja viável, tal combinação permanece um desafio devido aos efeitos de inativação do biocatalisador durante a etapa de foto-oxidação. Algumas alternativas para melhorar essa reação podem ser sugeridas como a compartimentalização do fotocatalisador e/ou do biocatalisador, uso dos catalisadores imobilizados ou utilização dessa cascata em fluxo contínuo.

Por fim, uma reação em cascata totalmente enzimática utilizando uma fotoenzima foi desenvolvida por Huijbers e colaboradores.⁵⁹ Pela primeira vez a enzima fotodescarboxilase de *Chlorella variabilis* (CvFAP) foi utilizada em um sistema em cascata. Nessa reação, foram obtidos álcoois, alcanos, e alcenos de cadeia longa (39) a partir de triglicéridos utilizando uma lipase para a hidrólise dos triglicéridos (37) e a CvFAP para a descarboxilação destes ácidos graxos como apresentado no Esquema 12.

Inicialmente essa cascata foi realizada em um sistema *one-pot* sequencial utilizando a lipase de *Candida rugosa* (CrLIP) e o extrato de celular de *E. coli* contendo CvFAP irradiado com luz LED azul onde foi obtida uma conversão geral de até 83% utilizando como substrato a trioleína.⁵⁴

Em uma outra abordagem, foram utilizadas células integras de *E. coli* contendo CvFAP sob exposição à luz azul utilizando como materiais de partida óleos naturais (resíduos) produzindo concentrações do produto (alcanos) de até 24 g L⁻¹ em 48 h.⁶⁰ Além da produção de alcanos descrita acima, Ma e colaboradores produziram o álcool (*R, Z*)-octadec-9-en-7-ol a partir de óleo de rícino.⁵⁵ Nesse caso, o óleo de rícino foi hidrolisado por uma lipase gerando o ácido ricinoléico que, por sua vez, foi descarboxilado por CvFAP sob irradiação de luz azul resultando em concentrações de produto de até 60 mmol L⁻¹. Devido ao acúmulo de ácidos graxos na mistura de reação, os autores sugeriram uma otimização adicional dessa cascata enzimática para compensar a queda de pH e que resultaria em melhor rendimento geral do produto.⁶¹

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síntese de compostos polifuncionalizados comumente

demandam transformações distintas e numerosas, contando com o isolamento dos intermediários a cada etapa realizada. Assim, além de necessitar de um maior esforço operacional, os rendimentos também acabam por diminuir, já que parte do material é perdida quase que inevitavelmente em processos de isolamento e purificação. Esse aspecto acarreta em maior consumo de recursos e, conseqüentemente, uma maior geração de resíduos. Todos esses aspectos podem ser contornados com a implementação dessas reações em sistemas em cascata. As reações em cascata bi- ou multienzimáticas, quimioenzimáticas e fotoenzimáticas aliam as vantagens do uso de biocatalisadores às vantagens dos sistemas em cascata, promovendo um efeito sinérgico em relações aos aspectos de sustentabilidade ambiental e econômico do processo. Entretanto, ainda são necessários esforços para contornar as limitações relativas à incompatibilidade dos catalisadores utilizados e de algumas condições reacionais.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), GlaxoSmithKline e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos projetos em rede CERSusChem (Proc. 2014/50249-8), INCTBioNat (Proc. 465637/2014-0) e Projeto Regular FAPESP Proc. 2019/15230-8. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - (Código de Financiamento 001, Proc. 88887.341669/2019-00). Agradecemos ainda à CAPES pela manutenção do Portal de Periódicos.

REFERÊNCIAS

- Ratti, R.; *SN Appl. Sci.* **2020**, *2*, 1.
- de Marco, B. A.; Rechelo, B. S.; Tótolí, E. G.; Kogawa, A. C.; Salgado, H. R. N.; *Saudi Pharm. J.* **2019**, *27*, 1.
- Anastas, P.; Eghbali, N.; *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301.
- Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J. H.; *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *33*, 2239.
- Nicolau, K. C.; Edmonds, D. J.; Bulger, P. G.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7134.
- Sperl, J. M.; Sieber, V.; *ACS Catal.* **2018**, *8*, 2385.
- Gandomkar, S.; Żądło-Dobrowolska, A.; Kroutil, W.; *ChemCatChem* **2019**, *11*, 2025.
- Muschiol, J.; Peters, C.; Oberleitner, N.; Mihovilovic, M. D.; Bornscheuer, U. T.; Rudroff, F.; *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5798.
- Schrittwieser, J. H.; Velikogne, S.; Hall, M.; Kroutil, W.; *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270.
- Cutlan, R.; De Rose, S.; Isupov, M. N.; Littlechild, J. A.; Harmer, N. J.; *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2020**, *868*, 140322.
- Nicolau, K. C.; Chen, J. S.; *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2993.
- Li, Man-Bo.; Backvall, Jan-E.; *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 2275.
- Mondal, S.; Ballav, T.; Biswas, K.; Ghosh, S.; Ganesh, V.; *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 10.1002/ejoc.202100312.

14. Elinson, M. N.; Vereshchagin, A. N.; Ryzkov, F. V.; *Curr. Org. Chem.* **2017**, *21*, 1427.
15. Li, F.; Tang, X.; Xu, Y.; Wang, C.; Wang, Z.; Li, Z.; Wang, L.; *Org. Lett.* **2020**, *22*, 3900.
16. Rioz-Martínez, A.; Bisogno, F. R.; Rodríguez, C.; De Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Torres Pazmiño, D. E.; Fraaije, M. W.; Gotor, V.; *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1431.
17. Brenna, E.; Crotti, M.; Gatti, F. G.; Monti, D.; Parmeggiani, F.; Pugliese, A.; *Molecules* **2017**, *22*, 1591.
18. Sehl, T.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Wardenga, R.; Von Lieres, E.; Offermann, H.; Westphal, R.; Pohl, M.; Rother, D.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 6772.
19. Hult, K.; Berglund, P.; *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231.
20. Fu, Y.; Fan, B.; Chen, H.; Huang, H.; Hu, Y.; *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 555.
21. Chen, K.; Arnold, F. H.; *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 203.
22. France, S. P.; Hepworth, L. J.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L.; *ACS Catal.* **2017**, *7*, 10.
23. Sheldon, R. A.; Woodley, J. M.; *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801.
24. Binder, J. T.; Kirsch, S. F.; *Chem. Commun.* **2007**, *40*, 4164.
25. Baer, K.; Krauß, M.; Burda, E.; Hummel, W.; Berkessel, A.; Gröger, H.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9355.
26. Fonseca, T. de S.; Lima, L. D.; de Oliveira, M. da C. F.; de Lemos, T. L. G.; Zampieri, D.; Molinari, F.; de Mattos, M. C.; *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *18*, 2110.
27. Yin, C.; Wu, W.; Hu, Y.; Tan, X.; You, C.; Liu, Y.; Chen, Z.; Dong, X. Q.; Zhang, X.; *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 2119.
28. Hamada, T.; Torii, T.; Izawa, K.; Noyori, R.; Ikariya, T.; *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4373.
29. Chen, X.; Zhang, H.; Feng, J.; Wu, Q.; Zhu, D.; *ACS Catal.* **2018**, *8*, 3525.
30. Mangas-Sánchez, J.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Malpartida, F.; Gotor, V.; *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2115.
31. Westerbeek, A.; Van Leeuwen, J. G. E.; Szymański, W.; Feringa, B. L.; Janssen, D. B.; *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7645.
32. Cui, H.; Xie, L.; Wan, N.; He, Q.; Chen, Y.; Li, Z.; *Green Chem.* **2019**, *21*, 4324.
33. Yang, Y.; Liu, J.; Li, Z.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 3120.
34. Kille, S.; Zilly, F. E.; Acevedo, J. P.; Reetz, M. T.; *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 738.
35. Tang, X. L.; Ye, G. Y.; Wan, X. Y.; Li, H. W.; Zheng, R. C.; Zheng, Y. G.; *Biochem. Eng. J.* **2020**, *161*, 107708.
36. Gul, I.; Fantaye Bogale, T.; Deng, J.; Wang, L.; Feng, J.; Tang, L.; *J. Biotechnol.* **2020**, *311*, 19.
37. Wan, N.; Tian, J.; Wang, H.; Tian, M.; He, Q.; Ma, R.; Cui, B.; Han, W.; Chen, Y.; *Bioorg. Chem.* **2018**, *81*, 529.
38. Wu, K.; Tang, L.; Cui, H.; Wan, N.; Liu, Z.; Wang, Z.; Zhang, S.; Cui, B.; Han, W.; Chen, Y.; *ChemCatChem* **2018**, *10*, 5410.
39. Van Beilen, J. B.; Funhoff, E. G.; Van Loon, A.; Just, A.; Kaysser, L.; Bouza, M.; Holtackers, R.; Röthlisberger, M.; Li, Z.; Witholt, B.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 59.
40. Lutz, J. F.; Ouchi, M.; Liu, D. R.; Sawamoto, M.; *Science* **2013**, *341*, 1238149.
41. Mapas, J. K. D.; Thomay, T.; Cartwright, A. N.; Ilavsky, J.; Rzaev, J.; *Macromolecules* **2016**, *49*, 3733.
42. Hill, M. R.; Carmean, R. N.; Sumerlin, B. S.; *Macromolecules* **2015**, *48*, 5459.
43. Shen, L.; Lu, Q.; Zhu, A.; Lv, X.; An, Z.; *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 625.
44. Engelis, N. G.; Anastasaki, A.; Nurumbetov, G.; Truong, N. P.; Nikolaou, V.; Shegiwal, A.; Whittaker, M. R.; Davis, T. P.; Haddleton, D. M.; *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 171.
45. Xu, J.; Jung, K.; Boyer, C.; *Macromolecules* **2014**, *47*, 4217.
46. Liu, Z.; Lv, Y.; An, Z.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 13852.
47. Allegranza, M. L.; Konkolewicz, D.; *ACS Macro Lett.* **2021**, *10*, 433.
48. Leitner, C.; Volc, J.; Haltrich, D.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 3636.
49. Zhang, B.; Wang, X.; Zhu, A.; Ma, K.; Lv, Y.; Wang, X.; An, Z.; *Macromolecules* **2015**, *48*, 7792.
50. Concia, A. L.; Lozano, C.; Castillo, J. A.; Parella, T.; Joglar, J.; Clapés, P.; *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3808.
51. Beerens, K.; Desmet, T.; Soetaert, W.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 823.
52. Cho, B. H.; Kim, J. H.; Jeon, H. B.; Kim, K. S.; *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4341.
53. Meher, G.; Krishnamurthy, R.; *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 703.
54. Chuaboon, L.; Wongnate, T.; Punthong, P.; Kiattisewee, C.; Lawan, N.; Hsu, C. Y.; Lin, C. H.; Bornscheuer, U. T.; Chaiyen, P.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 2428.
55. Pitsawong, W.; Sucharitakul, J.; Prongjit, M.; Tan, T. C.; Spadiut, O.; Haltrich, D.; Divne, C.; Chaiyen, P.; *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9697.
56. Seiboth, B.; Gamauf, C.; Pail, M.; Hartl, L.; Kubicek, C. P.; *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 890.
57. Özgen, F. F.; Runda, M. E.; Schmidt, S.; *ChemBioChem* **2021**, *22*, 790.
58. Gacs, J.; Zhang, W.; Knaus, T.; Mutti, F. G.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F.; *Catalysts* **2019**, *9*, 305.
59. Huijbers, M. M. E.; Zhang, W.; Tonin, F.; Hollmann, F.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *57*, 13648.
60. Ma, Y.; Zhang, X.; Li, Y.; Li, P.; Hollmann, F.; Wang, Y.; *Sustainable Energy Fuels* **2020**, *4*, 4232.
61. Ma, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Li, P.; Li, Y.; Hollmann, F.; Wang, Y.; *ChemPhotoChem* **2020**, *4*, 39.