

Artigo

3-Hidroxi-Octadecanoato de Metila, Biomarcador de Endotoxina: Uma Síntese Rápida

Amador, I. R.;* Pinto, P. P.; Sabino, F. C.; Brito, T. O.; Solci, M. C.

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (3), 839-847. Data de publicação na Web: 5 de junho de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>

Methyl 3-Hydroxy-Octadecanoate, Biomarker of Endotoxin: A Quick Synthesis

Abstract: Endotoxins can affect human health acting kidney, brain and heart. It can be found in ambient air associated with airborne particulate matter. The quantification of endotoxin can be performed by determination of 3-hydroxy fatty acids with gas chromatography. The 3-hydroxy fatty acids are not easily available and have high cost, hindering environmental endotoxin measures. The aim of this work is to propose a synthetic route of 3-hydroxy fatty acids, inexpensive and readily reproduced in the laboratory. The synthesis was made in five steps with formation of intermediates (hexadecanoyl chloride, Meldrum's acid, 2,2-dimethyl-5-(hexadecan-1-one)-1,3-dioxone-4,6-dione), and the final product methyl 3-hydroxy-octadecanoate. All reagents are low cost and the reactions were performed in mild conditions. The product obtained was characterized by ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS).

Keywords: Methyl 3-hydroxy-octadecanoate; biomarkers; endotoxin.

Resumo

As endotoxinas podem afetar a saúde humana atuando em rins, cérebro e coração. São encontradas no ar ambiente associado ao material particulado atmosférico. A quantificação de endotoxinas pode ser realizada pela determinação dos 3-hidroxi-ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa. Os 3-hidroxi-ácidos graxos não estão disponíveis com facilidade e possuem custos elevados, dificultando medidas de endotoxinas no ar ambiente. Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma via sintética de baixo custo dos 3-hidroxi-ácidos graxos e que seja facilmente reproduzida em laboratório. A síntese foi efetuada em cinco etapas com formação dos intermediários (cloreto de hexadecanoila, ácido de Meldrum, 2,2-dimetil-5-(hexadecano-1-ona)-1,3-dioxano-4,6-diona) e o produto final 3-hidróxi-octadecanoato de metila. Todos os reagentes são de baixo custo e as reações foram realizadas em condições brandas. O produto obtido foi caracterizado por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas (EM).

Palavras-chave: 3-Hidroxi octadecanoato de metila; biomarcador; endotoxina.

* Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Química, CEP 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

 ir.amador@hotmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20170053](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170053)

3-Hidroxi-Octadecanoato de Metila, Biomarcador de Endotoxina: Uma Síntese Rápida

Ismael R. Amador,^{a,b} Jurandir P. Pinto,^{a,b} Fabio C. Sabino,^{a,b} Tiago O. Brito,^a Maria Cristina Solci^{a,b}

^a Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Química, CEP 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Energia e Ambiente

* ir.amador@hotmail.com

Recebido em 24 de fevereiro de 2017. Aceito para publicação em 4 de junho de 2017

1. Introdução
2. Resultados e discussão
3. Materiais e métodos
 - 3.1. Instrumentação
 - 3.2. Reagentes
4. Experimental
5. Conclusão

1. Introdução

As endotoxinas são constituintes da membrana externa nas bactérias gram-negativas. Uma vez na corrente sanguínea do ser humano, sua ação pode comprometer órgãos essenciais como os rins, cérebro e coração. São compostas de antígeno O, cerne (interno e externo) e lipídio A.¹ Ao lipídio A estão ligados dois pares de 3-hidroxi-ácidos graxos (3-OHAG) na forma de ésteres ou amidas.² Por essa particularidade, os 3-OHAG são utilizados como biomarcadores na determinação de endotoxinas.³

As endotoxinas são encontradas associadas ao material particulado

atmosférico (MP) em diferentes ambientes rural e urbano.⁴ Em ambiente rural as endotoxinas foram determinadas em locais de atividades de suinocultura,⁵ avicultura⁶ e em estufas para crescimento de plantas.⁷ Em ambiente urbano foram determinadas no ar interno de salas de aula⁸ e em ar externo de regiões metropolitanas.⁹⁻¹²

A determinação das endotoxinas é frequentemente realizada através da técnica do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL).¹³⁻¹⁶ Embora seja amplamente empregada, esta técnica possui elevado custo e apresenta algumas inconsistências que são observadas em sua aplicação.¹⁷ Outras técnicas podem ser empregadas na quantificação de endotoxinas como exemplos, os sensores colorimétricos,¹⁸ os biosensores¹⁹ e a

cromatografia a gás (CG). Na técnica cromatográfica as endotoxinas são quantificadas utilizando os biomarcadores (3-OHAG).³ Para isso, os 3-OHAG são liberados por hidrólise ácida na forma de ésteres (3-OHEAG), derivatizados com trimetilsilano (TMS), separados e quantificados com detecção por espectrometria de massa (EM) e por ionização na chama (DIC).^{3,20} Os 3-OHAG ou os 3-OHEAG quando utilizados como padrões de referência para as determinações de endotoxina são pouco acessíveis comercialmente e possuem custo elevado, dificultando assim os ensaios utilizando a CG.

Considerando a necessidade de viabilizar

estudos sobre endotoxinas associadas ao MP atmosférico, principalmente em ambiente laboral, este trabalho teve como objetivo a síntese de padrão de referência 3-hidroxi-octadecanoato de metila para determinação cromatográfica de endotoxinas em ambientes impactados por bioaerossóis.

2. Resultados e discussão

A Figura 1 ilustra as cinco etapas envolvidas na síntese do biomarcador 3-hidroxi-octadecanoato de metila (3-OHODM).

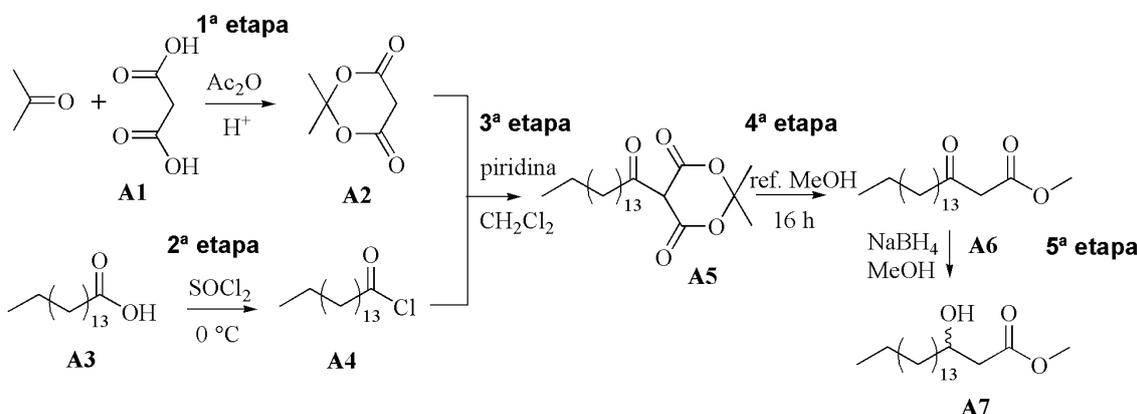


Figura 1. Representação da rota sintética para a produção do biomarcador 3-hidroxi-octadecanoico de metila; **A1**) ácido malônico, **A2**) ácido de Meldrum, **A3**) ácido hexadecanóico, **A4**) cloreto de hexadecanoila, **A5**) 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxona-4,6-diona, **A6**) 3-oxo-octadecanoato de metila e **A7**) 3-hidroxi-octadecanoato de metila

A síntese do biomarcador 3-hidroxi-octadecanoato de metila (**A7**) foi realizada em cinco etapas. O primeiro produto formado 2,2-dimetil-1,3-dioxona-4,6-diona ou ácido de Meldrum (**A2**) foi facilmente obtido pela ciclização do ácido malônico (**A1**) com a propanona.²¹ A fácil disponibilidade dos reagentes utilizados e as condições brandas da reação compensaram o moderado rendimento desta etapa (68 %), embora **A2** seja comercialmente acessível. A caracterização do produto formado foi feita por comparação do espectro no infravermelho com dados da literatura. No

espectro IV foi possível observar principalmente duas bandas intensas de deformação axial das carbonilas (1793 e 1794 cm^{-1}) e duas bandas de média intensidade características de deformação axial C-H metilênico (3004 , 2931 cm^{-1}).

Para certificação da formação do cloreto de hexadecanoila (**A4**) formado na segunda etapa foi utilizada a técnica de gravimetria com rendimento de 79 %. Embora essa seja uma técnica simples, foi necessário bidestilar o cloreto de tionila e manter a atmosfera da reação inerte, uma vez que reagente e produto são relativamente instáveis.

Existem alguns relatos na literatura que descrevem as etapas subsequentes (terceira e quarta etapa), porém, estas envolvem a utilização de ácidos graxos de cadeias carbônicas menores,^{22,23} sendo que até o momento, não existem relatos descrevendo o uso do ácido hexadecanóico (**A3**). Na sequência da síntese (terceira etapa), o 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxona-4,6-diona (**A5**) formado resultou em um sólido branco amorfo de com rendimento de 82 %. Que após abertura da dilactona (etapa 4), forneceu o 3-oxo-octadecanoato de metila (**A6**) que se apresentou como um sólido branco amorfo com rendimento de 68 %. Os dados de RMN ¹H e ¹³C comparados aos dados da literatura foram utilizados para a caracterização de **A6**. No espectro de RMN ¹H foi possível observar principalmente um singleto em δ 3,76 condizentes com os hidrogênios da metoxila e um singleto em δ 3,46 atribuído aos dois hidrogênios α -carbonilas. O espectro de RMN ¹³C apresentou principalmente dois sinais atribuídos a dois carbonos carbonílicos, δ 202,90 e 167,72 atribuídos aos carbonos de cetona e éster, respectivamente e o deslocamento em δ 51,44 atribuído ao carbono da metoxila. Os dados de **A6** também foram comparados com dados da literatura.²⁴

Para a redução da cetona na etapa final da síntese, trabalhos descritos na literatura focaram a enantiosseletividade e utilização de cadeias alifáticas menores. Nestes casos o processo de redução ocorreu utilizando catalizadores quirais, altas pressões, baixas temperaturas ou a combinação de algumas destas variáveis.²⁵⁻²⁸ Desse modo, é importante ressaltar que para utilizar os 3-OHODM como biomarcador não é necessário que sejam enantiosseletivos, portanto a redução da carbonila pode ser conduzida em condições brandas de reação. Na rota proposta, a redução da carbonila foi realizada utilizando boro-hidreto de sódio. Como produto final foi obtido o 3-hidroxi-octadecanóico (**A7**), um sólido branco amorfo com massa de 1,58 g e rendimento

relativamente elevado. Como o reagente **A6** possui baixa solubilidade em metanol comprometendo o rendimento da reação, a alternativa encontrada foi solubilizar **A6** em quantidade adequada de éter etílico e a seguir adicionado ao metanol. Este procedimento de solubilização e a adição lenta de boro-hidreto de sódio foram fundamentais para a obtenção de bom rendimento (89 %) do produto final.

A estrutura do padrão **A7** foi caracterizada pelas técnicas de RMN de ¹H e ¹³C e por espectrometria de massas. Através dos espectros de RMN ¹H foram observados principalmente um singleto em δ 3,72 atribuído aos hidrogênios da metoxila e um duplo duplete em δ 2,42 e 2,53 atribuídos aos hidrogênios α -carbonila. No espectro de RMN de ¹³C pode ser observado com maior evidencia os deslocamentos do carbono carbonílico de éster em δ 173,63, o carbono de metoxila em δ 51,87, além do sinal em δ 41,17 de -CH₂- α -carbonila e um sinal de -CH- em δ 68,19 de um carbono ligado a hidroxila. Além disso, no espectro de massas apresenta o pico do íon base em *m/z* 103 que é característico de um fragmento de um éster com uma hidroxila no carbono α -carbonila, como apresentado nas figuras Figura 2 e 3.

A pureza do padrão sintetizado **A7** pode ser averiguada através dos espectros de RMN de ¹H onde não se observou sinais incompatíveis com o produto final, o que garante uma pureza mínima de 95%. Os sinais observados no espectro de ¹³C mostraram-se compatíveis com o produto esperado, sendo que também não foram observados sinais de carbonos provenientes de impurezas. Complementarmente a pureza do padrão foi verificada pela técnica cromatográfica com detecção por espectrometria de massas (Figura 3) com o pico cromatográfico em 18,5 min e o correspondente espectro de massas evidenciando o característico íon base *m/z* 103 (100%, [M-C₁₅H₃₁]⁺). Ainda, no cromatograma não foram observados outros picos além do composto em questão.

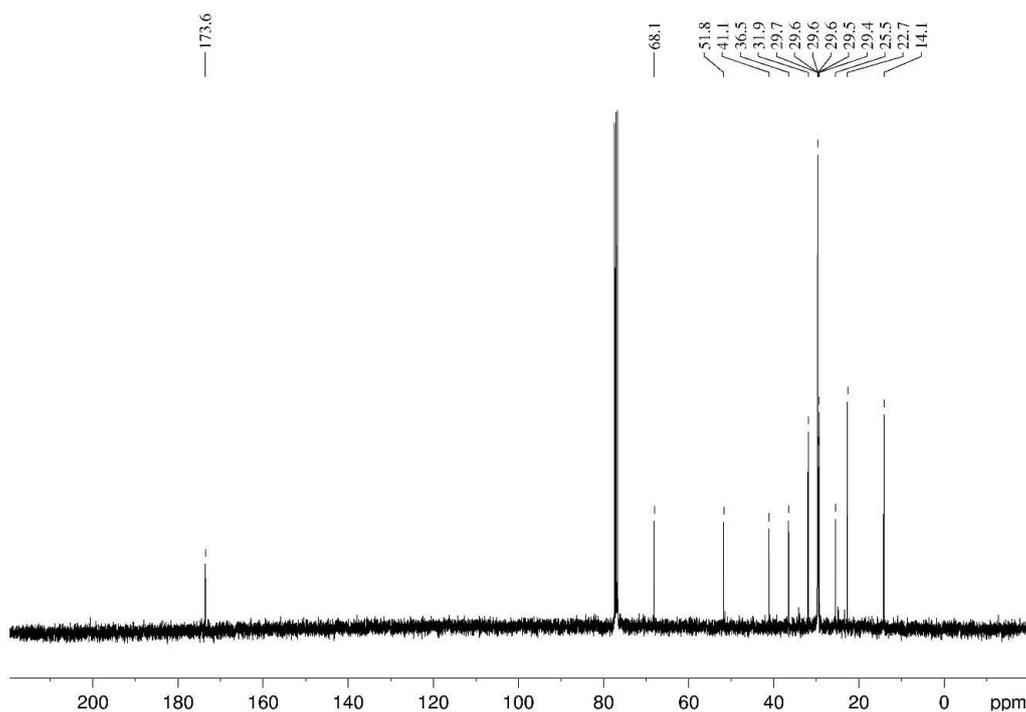


Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz) do padrão sintetizado 3-hidroxi-octadecanoato de metila

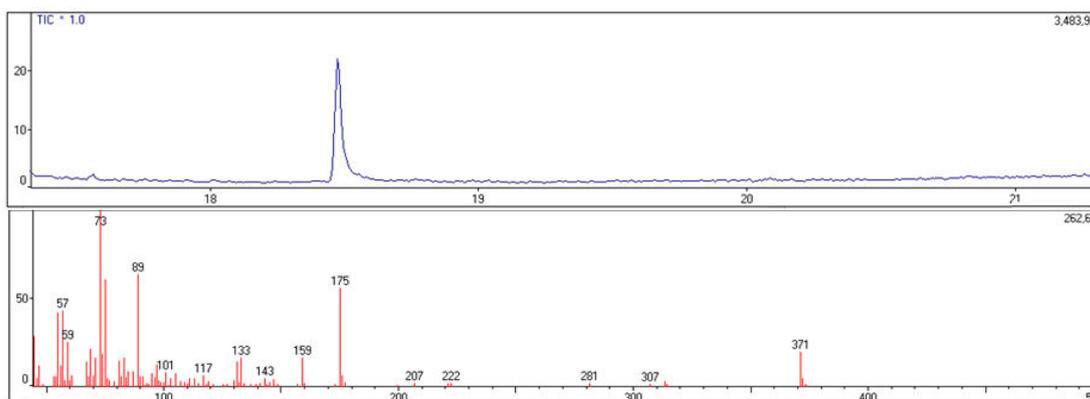


Figura 3. Cromatograma e espectro de massas do padrão sintetizado 3-hidroxi-octadecanoato de metila

3. Materiais e métodos

3.1. Instrumentação

Os espectros no infravermelho foram obtidos no espectrômetro Shimadzu FT-IR, modelo 8300, em pastilha de KBr. Os

espectros de RMN foram obtidos no espectrofotômetro Bruker, modelo Avance III operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Os espectros foram registrados utilizando TMS como padrão interno. Os cromatógrafos a gás (CG) utilizados foram da marca Shimadzu 17-A acoplado ao espectrômetro de massas QP500 (CG-EM) e

Shimadzu GC-17A com detector de ionização na chama (CG-DIC). Para CG-EM e CG-DIC foi utilizada a coluna de sílica fundida Phenomenex® Zebron™ ZB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e espessura de filme 0,25 µm).

Condições cromatográficas: CG-DIC, nitrogênio como gás de arraste na vazão de 1,1 ml min⁻¹; temperatura do injetor e detector a 320 °C; temperatura do forno iniciando em 90 °C mantendo-se por 3,5 min, elevando-se a 290 °C com taxa de 20 °C min⁻¹, permanecendo por 16,5 min; injeção de 2 µL, modo *split* 1:10. CG-EM, temperaturas do injetor e fonte 320 °C, interface 330 °C; hélio como gás de arraste na vazão de 1,1 ml min⁻¹; temperatura do forno iniciando em 90 °C mantendo-se por 3,5 min, elevando-se a 290 °C com taxa de 20 °C min⁻¹, permanecendo por 16,5 min; injeção de 2 µL, modo *split* 1:20.

3.2. Reagentes

Os solventes e reagentes grau P.A.: hexano, diclorometano, metanol e éter etílico (Biotec®); propanona, piridina e ácido malônico (Vetec); ácido sulfúrico e anidrido acético (Nuclear); ácido clorídrico, carbonato de potássio e hidróxido de sódio; cloreto de tionila, boro-hidreto de potássio (Synth).

4. Experimental

Resumidamente a rota sintética iniciou com a ciclização do ácido malônico com propanona (**A1** → **A2**) paralelamente à cloração do ácido hexadecanóico (**A3** → **A4**), seguido da substituição em C-5 do ácido de Meldrum (**A2** + **A4** → **A5**), a descarboxilação (**A5** → **A6**) e finalizando com a redução da carbonila cetônica (**A6** → **A7**) para formar o padrão biomarcador 3-OHODM.

A primeira e segunda etapas foram realizadas em paralelo durante o

desenvolvimento da síntese. A obtenção de **A2** na primeira etapa foi através da adição de ácido malônico (44,2 mmol; 4,6 g) em anidrido acético (50,4 mmol; 4,8 mL) sob agitação magnética em banho de gelo, seguida da adição lenta de ácido sulfúrico concentrado (3,0 mmol, 0,16 mL) e adição de propanona (54,48 mmol; 4,0 mL) após 20 min. Posteriormente a mistura reacional foi mantida sob refrigeração (≈ 8°C) por 12 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água ultrapura gelada,²¹ resultando em 4,32 g de um sólido branco cristalino. A caracterização foi obtida por comparação dos dados de infravermelho com os da literatura.^{29,30} **Ácido de Meldrum:** (KBr) $\bar{\nu}$: 3004, 2931, 1793, 1794 cm⁻¹.

Na segunda etapa, para formação de **A4**, foi adicionado ácido hexadecanóico (19,5 mmol; 5,0 g) em cloreto de tionila (165,4 mmol; 12 mL) a temperatura ambiente (25 °C), atmosfera inerte (N₂) e agitação magnética por 30 min. Decorrido esse período, o excesso de cloreto de tionila foi removido por destilação simples dando um líquido âmbar com massa de 4,23 g.

A formação do 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxona-4,6-diona (**A5**) ocorreu através da reação entre **A2** (10,20 mmol; 1,47 g) previamente solubilizado em diclorometano (12,0 mL) e **A4** na presença de piridina sob agitação magnética por 90 min em banho de gelo. Na sequência, as impurezas foram extraídas com HCl 2,0 M (3 x 50 mL) e água ultrapura (3 x 50 mL). O solvente orgânico foi removido por evaporação rotativa obtendo-se 3,18 g.³¹

Na quarta etapa, **A5** foi suspenso em metanol e submetido a refluxo por 16 h. Ao final desse período o solvente foi removido utilizando o rotaevaporador. O sólido resultante nesta etapa foi dissolvido em 50 mL éter etílico para retirada das impurezas com solução de K₂CO₃ (3 x 15 mL; 0,72M) e de água ultrapura (3 x 15 mL). Na sequência, o solvente orgânico foi removido por evaporação rotativa fornecendo o 3-oxooctadecanoato de metila (**A6**), um sólido amorfo com massa de 1,78 g.³¹ A formação

de **A6** foi monitorado por CG-DIC e confirmado por dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , comparando com dados da literatura.²⁴ **3-oxo-octadecanoato de metila**: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3,68 (s, 3H); 3,46 (s, 2H); 2,54 (t, $J = 7,4$ Hz); 1,61 (m, 2H); 1,29 (m, 24H); 0,89 (t, $J = 6,9$ Hz). (RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 202,9; 167,7; 52,4; 49,0; 43,1; 31,9; 29,5; 29,3; 29,0; 23,4; 22,7; 14,1.

A quinta e última etapa, o intermediário **A6** (5,67 mmol; 1,78 g) foi dissolvido em éter etílico e adicionado em metanol (50 mL). Essa solução foi submetida à agitação magnética com adição lenta de boro-hidreto de sódio (5,80 mmol; 0,312 g) em banho de gelo por 15 minutos. O produto final formado **A7** foi extraído do meio reacional com diclorometano (3 x 15 mL).³² Após extração o solvente orgânico foi removido com uso do evaporador rotativo fornecendo um sólido amorfo branco. **A7** foi caracterizado por RMN de ^1H , de ^{13}C e CG-EM. **3-hidroxi-octadecanoato de metila**: RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4,06 – 3,98 (m, 1H); 3,72 (s, 3H); 3,53 (s, 1H); 2,53 (dd, $J = 16,2$; 3,2 Hz, 1H); 2,43 (dd, $J = 16,2$; 9,0 Hz, 1H); 1,47 – 1,41 (m, 2H); 1,36 – 1,20 (m, 26H); 0,88 (t, $J = 7,0$). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) (Figura 1S): δ 173,7; 68,2; 51,1; 41,2; 36,6; 32,0; 29,8; 29,7; 29,6; 29,5; 25,6; 22,8; 14,2. EM (DIE): m/z 103 (100%, $[\text{M}-\text{C}_{15}\text{H}_{31}]^+$).

5. Conclusão

Foi sintetizado o éster 3-hidroxi-octadecanoato de metila, biomarcador utilizado para a determinação cromatográfica de endotoxinas em material particulado atmosférico. Foram utilizados materiais de partida de fácil aquisição e baixo custo. As condições reacionais foram brandas, podendo ser facilmente reproduzidas. A rota de síntese proposta poderá ser aplicada para a obtenção dos demais biomarcadores presentes nas endotoxinas. O padrão obtido pode ser empregado na determinação cromatográfica de endotoxinas em substituição a técnicas de maior custo.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e Fundação Araucária pela bolsa de estudo e auxílios financeiros. Em especial ao Laboratório Multiusuário de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina.

Referências Bibliográficas

- Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, S. J.; Morse, S. A. e Mietzner, T. A. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 25ª ed. AMGH: Rio de Janeiro, 2012.
- Raetz, C. R. H. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *Journal of Bacteriology* **1993**, *175*, 18. [CrossRef] [PubMed]
- Lee, A. K. Y.; Chan, C. K.; Fang, M.; Lau, A. P. S. The 3-hydroxy fatty acids as biomarkers for quantification and characterization of endotoxins and Gram-negative bacteria in atmospheric aerosols in Hong Kong. *Atmospheric Environment* **2004**, *38*, 37. [CrossRef]
- Barnig, C.; Reboux, G.; Roussel, S.; Casset, A.; Sohy, C.; Dalphin, J.-C.; de Blay, F. Indoor dust and air concentrations of endotoxin in urban and rural environments. *Letters in Applied Microbiology* **2013**, *56*, 3. [CrossRef] [PubMed]
- Basinas I.; Schlünssen, V.; Takai, H.; Heederik, D.; Omland, Ø.; Wouters, T.; Sigsgaard, I. M.; Kromhout, H. Exposure to inhalable dust and endotoxin among Danish pig farmers affected by work tasks and stable characteristics. *The Annals of Occupational Hygiene* **2013**, *57*, 8. [CrossRef] [PubMed]
- Matković, K.; Vučemilo, M.; Vinković, B. Dust and endotoxin in laying hen dwellings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **2012**, *36*, 2. [CrossRef]
- Madsen, A. M.; Tendal, K.; Frederiksen, M. W. Attempts to reduce exposure to fungi, β -glucan, bacteria, endotoxin and dust in vegetable greenhouses and a packaging unit.

- Science of the Total Environment* **2014**, 468-469. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Jacobs, J. H.; Krop, E. J. M.; Borrás-Santos, A.; Zock, J.-P.; Taubel, M.; Hyvarinnen, A.; Pekkanen, J.; Doekes, G.; Heederik, D. J. J. Endotoxin levels in settled airborne dust in European schools: the HITEA school study. *Indoor Air* **2014**, 24, 2. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Morgenstern, V.; Carty, C. L.; Gehring, U.; Cyrys, J.; Bischof, W.; Heinrich, J. Lack of spatial variation of endotoxin in ambient particulate matter across a German metropolitan area. *Atmospheric Environment* **2005**, 39, 36. [CrossRef]
- ¹⁰ Degobbi, C.; Lopes, F. D. T. Q. S.; Carvalho-Oliveira, R.; Muñoz, J. E.; Saldiva, P. H. N. Correlation of fungi and endotoxin with PM_{2.5} and meteorological parameters in atmosphere of Sao Paulo, Brazil. *Atmospheric Environment* **2011** 45, 13. [CrossRef]
- ¹¹ Wheeler, A. J.; Dobbin, N. A.; Lyrette, N.; Wallace, L.; Foto, M.; Mallick, R.; Kearney, J. K.; Ryswyk, V.; Gilbert, N. L.; Harrison, I.; Rispler, K.; Héroux, M.-E. Residential indoor and outdoor coarse particles and associated endotoxin exposures. *Atmospheric Environment* **2011**. 45, 39. [CrossRef]
- ¹² Guan, T.; Yao, M.; Wang, J.; Fang, Y.; Hu, S.; Wang, Y.; Dutta, A.; Yang, J.; Wu, Y.; Hu, M.; Zhu, T. Airborne endotoxin in fine particulate matter in Beijing. *Atmospheric Environment* **2014**, 97. [CrossRef]
- ¹³ Duchaine, C.; Thorne, P. S.; Mériaux, A.; Grimard, Y.; Whitten, P.; Cormier, Y. Comparison of endotoxin exposure assessment by bioaerosol impinger and filter-sampling methods. *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, 67, 6. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Su, H.-J. J.; Chen, H.-L.; Huang, C.-F.; Lin, C.-Y.; Li, F.-C.; Milton, D. K. Airborne fungi and endotoxin concentrations in different areas within textile plants in Taiwan: A 3-year study. *Environmental Research* **2002**, 89, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Park, J.-H.; Cox-Ganser, J.; Rao, C.; Kreiss, K. Fungal and endotoxin measurements in dust associated with respiratory symptoms in a water-damaged office building. *International Journal of Indoor Environment and Health* **2006**, 16, 3. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Kirychuk, S. P.; Reynolds, S. J.; Koehncke, N. K.; Lawson, J.; Willson, P.; Senthilselvan, A.; Marciniuk, D.; Classen, H. L.; Crowe, T.; Just, N.; Schneberger, D.; Dosman, J. A. Endotoxin and dust at respirable and nonrespirable particle sizes are not consistent between cage- and floor-housed poultry operations. *The Annals of Occupational Hygiene* **2010**, 54, 7. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Duquenne, P.; Marchand, G.; Duchaine, C. Measurement of endotoxins in bioaerosols at workplace: A critical review of literature and a standardization issue. *The Annals of Occupational Hygiene* **2013**, 57, 2. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Sun, J.; Ge, J.; Liu, W.; Wang, X.; Fan, Z.; Zhao, W.; Zhang, H.; Wang, P.; Lee, S.-T. A facile assay for direct colorimetric visualization of lipopolysaccharides at low nanomolar level. *Nano Research* **2012**, 5, 7. [CrossRef]
- ¹⁹ Zuzuarregui, A.; Morant-Minana, M. C.; Perez-Lorenzo, E.; Martinez de Tejada, G.; Arana, S.; Mujika, M. Implementation and characterization of a fully miniaturized biosensor for endotoxin detection based on electrochemical techniques. *Sensors Journal, IEEE* **2014**, 14, 1. [CrossRef]
- ²⁰ Sinanoglou, V. J.; Strati, I. F.; Bratakos, S. M.; Proestos, C.; Zoumpoulakis, P.; Miniadis-Meimaroglou, S. On the combined application of iatroskan TLC-FID and GC-FID to identify total, neutral, and polar lipids and their fatty acids extracted from foods. *ISRN Chromatography* **2013**, 2013. [CrossRef]
- ²¹ Jin, T.-S.; Zhao, R.-Q.; Li, M.; Zhao, Y.; Li, T.-S. A quick and clean procedure for synthesis of 5-arylmethylene-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones in aqueous media. *Arkivoc* **2006**, 14, 53. [Link]
- ²² Scribner, J. D.; Smith, D L.; McCloskey, J. A. Meldrum's acid in organic synthesis. 2. A general and versatile synthesis of β -keto esters. *The Journal Organic Chemistry* **1978**, 43, 10. [CrossRef]
- ²³ Wu, C.; Miller, P. A.; Miller, M. J. Syntheses and studies of amamistatin B analogs reveals that anticancer activity is relatively

independent of stereochemistry, ester or amide linkage and select replacement of one of the metal chelating groups. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁴ Mordant, C.; Dünkermann, P.; Ratovelomanana-Vidal, V.; Genet, J.-P. Dynamic kinetic resolution: an efficient route to anti α -amino- β -hydroxy esters via Ru-SYNPHOS[®] catalyzed hydrogenation. *Chemistry Communication* **2004**, *11*, 1296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁵ Concellín, J. M.; Concellón, C. Aldol-type reactions of unmasked iodoacetic acid with carbonyl compounds promoted by samarium diiodide: Efficient synthesis of carboxylic 3-hydroxyacids and their derivatives. *Journal Organic Chemistry* **2006**, *71*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁶ Fukuzawa, S.-I.; Matsuzawa, H.; Yoshimitsu, S.-I. Asymmetric samarium-reformatsky reaction of chiral α -bromoacetyl-2-oxazolidinones with aldehydes. *Journal Organic Chemistry* **2000**, *65*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁷ Smith, S. M.; Uteuliyev, M.; Takacs, J. M. Catalytic asymmetric hydroboration of α,β -unsaturated Weinreb amides: striking influence of the borane. *Chemical Communication* **2011**, *47*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

²⁸ Ratovelomanana-Vidal, V.; Girard, C.; Touati, R.; Tranchier, J. P.; Hassine, B. B.; Genêt, J. P. Enantioselective hydrogenation of α -keto esters using chiral diphosphine-ruthenium complexes: optimization for academic and industrial purposes and synthetic application. *Advanced Synthesis Catalysis* **2003**, *345*, 1. [[CrossRef](#)]

²⁹ ²⁸Jiang, Hu; Zhang, Jian-Min; Du, Wei-Qiong; Zhu, Shi-Zheng. A convenient synthesis of novel Meldrum's acid C₆₀ fullerene derivatives. *Chinese Journal of Chemistry* **2007**, *25*, 1. [[CrossRef](#)]

³⁰ ²⁹Rudolf, Philipp; Buback, Johannes; Aulbach, Jochen; Nuernberger, Patrick; Brixner, Tobias. Ultrafast multisequential photochemistry of 5-diazo, Meldrum's acid. *Journal American Chemistry Society* **2010**, *132*, 43 [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

³¹ ³⁰Kocieński, P. J.; Pelotier, B.; Pons, J. M.; Prideaux, H. Asymmetric syntheses of panclicins A–E via $-[2+2]$ cycloaddition of alkyl(trimethylsilyl)ketenes to a β -silyloxyaldehyde. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1* **1998**, *8*. [[CrossRef](#)]

³² Yang, D.; Gao, Q.; Zheng, B.; Zhu, F. N. Y. Et₂AlCl-promoted asymmetric phenylseleno group transfer radical cyclization reactions of unsaturated β -hydroxy esters. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]