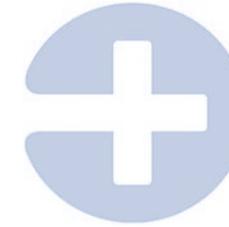
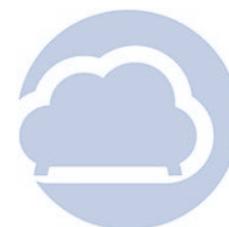
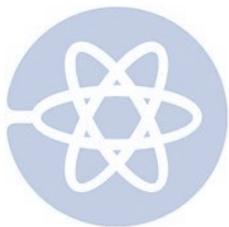


VII Scuola  
Nazionale di  
Didattica  
della  
Chimica  
«G. Del Re»

*La chimica  
per uno  
sviluppo  
sostenibile e  
l'educazione  
civica*

Bertinoro  
6-9  
Settembre  
2022



## Ossidazione degli alcoli

*Proposte per laboratori di  
chimica organica «green»  
con spunti multidisciplinari*

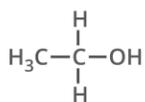
Sandro Jurinovich e Luigi Fabbrizzi

# Ossidazione degli alcoli

## A GUIDE TO OXIDATION REACTIONS OF ALCOHOLS

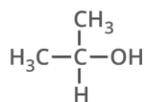
Compounds containing the alcohol functional group (–OH) can be oxidised to produce carbonyl compounds. Here's how it happens.

### THE REAGENTS



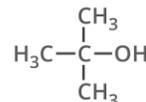
PRIMARY (1°) ALCOHOL

Carbon attached to –OH has one other carbon directly attached.



SECONDARY (2°) ALCOHOL

Carbon attached to –OH has two other carbons directly attached.



TERTIARY (3°) ALCOHOL

Carbon attached to –OH has three other carbons directly attached.

Alcohols can be oxidised to carbonyl compounds (containing a C=O bond) using an oxidising agent. Acidified dichromate (VI) salts can be used, though due to their toxicity alternative reagents can also be utilised, such as pyridinium chlorochromate (PCC).

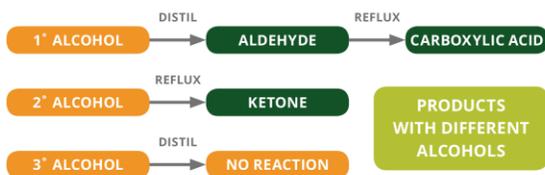


SODIUM DICHROMATE

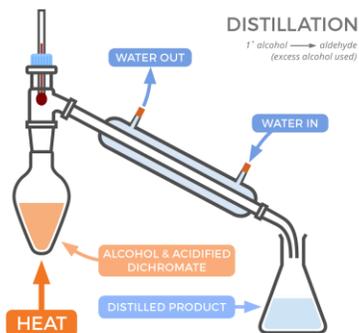


POTASSIUM DICHROMATE

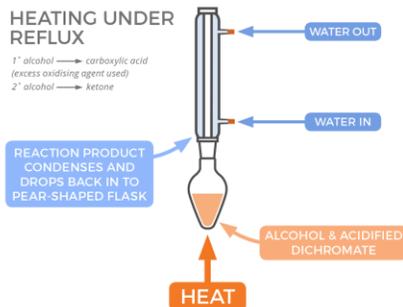
The type of compound obtained from the reaction depends on the starting alcohol (shown below). When an oxidation reaction is carried out with a dichromate salt, the dichromate ion ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) is reduced to the  $\text{Cr}^{3+}$  ion, giving a colour change from orange to dark green.



### THE APPARATUS

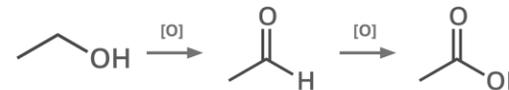


An aldehyde can be obtained from primary alcohols using distillation (above). Otherwise, heating under reflux (below) is used to make sure the alcohol is fully oxidised before distilling off the product.



### TESTING FOR REACTION PRODUCTS

Oxidising agents can be represented simply in chemical equations as [O]. An example reaction is shown below.



ETHANOL

ETHANAL

ETHANOIC ACID

Note: In step 1, water ( $\text{H}_2\text{O}$ ) is lost as a side product of the reaction



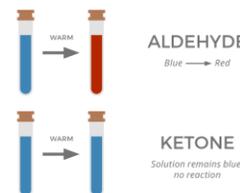
DICHROMATE (ORANGE)

CHROMIUM ION (GREEN)

There are two different chemical reactions that can be used to identify the products of oxidation reactions.

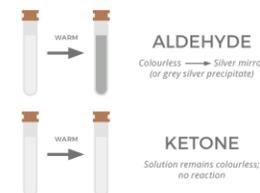
#### FEHLING'S SOLUTION

Contains complexed  $\text{Cu}^{2+}$  ions. Aldehydes reduce these ions to red copper (I) oxide. Ketones don't react with Fehling's solution.



#### TOLLEN'S REAGENT

Contains the diamine silver ion,  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ . Aldehydes reduce this to metallic silver, forming a silver mirror on the glass surface.

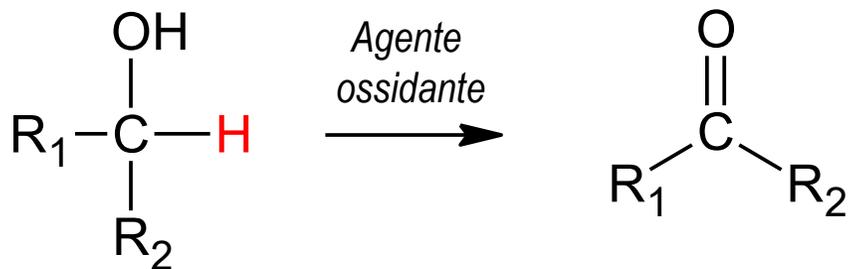
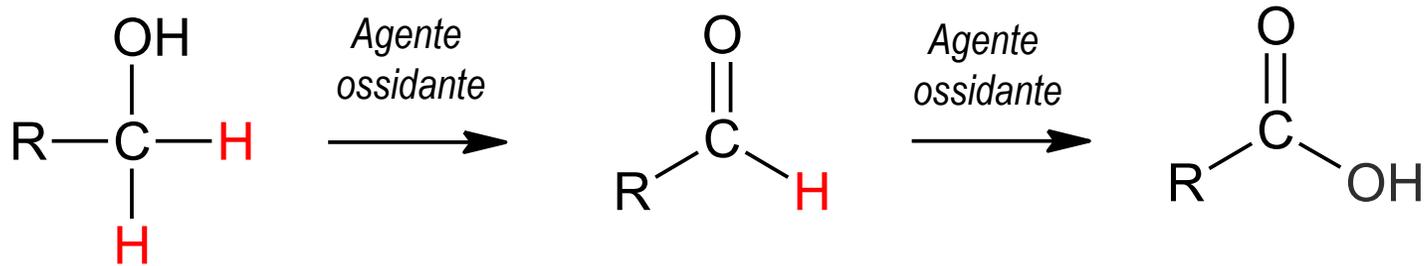


- Argomento importante nel *curriculum* di **chimica organica** (collegamento con funzionalità C=O)
- Permette di applicare trasversalmente i concetti relativi alle reazioni di **ossidazione**
- Applicazione delle **tecniche di base di lab.** di chimica organica
- Collegamenti con la **chimica analitica** per analisi dei prodotti (TLC, GC, IR)



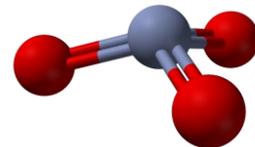
# Ossidazione degli alcoli

Gli alcoli che hanno almeno un atomo di idrogeno legato al carbonio a cui è legato il gruppo ossidrilico possono essere ossidati nei corrispondenti composti carbonilici



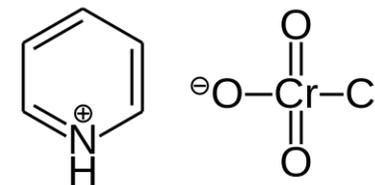
L'agente ossidante più comune è il reagente di *Jones* (**anidride cromica** disciolta in acido solforico) o  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 / \text{H}_2\text{SO}_4$

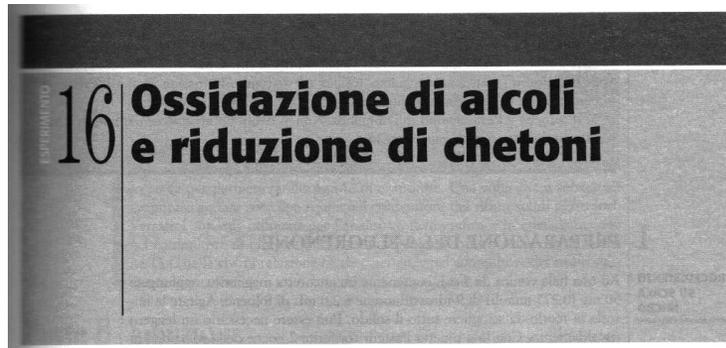
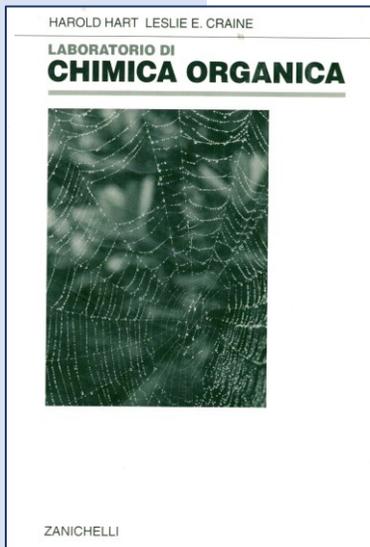
$\text{CrO}_3, \text{H}_2\text{SO}_4$   
 $\text{H}_2\text{O}$  (o acetone)



Nel caso degli alcoli primari, per fermare l'ossidazione all'aldeide, si utilizza il **clorocromato di piridinio (PCC)** solitamente in diclorometano in diclorometano

PCC,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$





*Agente ossidante*

**anidride cromica**

*Solvente*

**toluene**

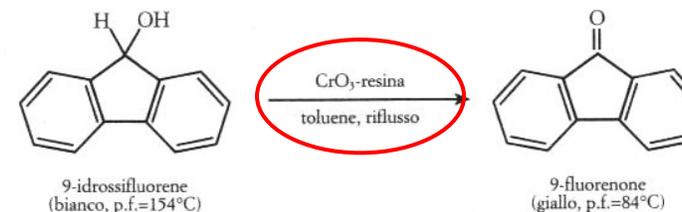
*Condizioni*

**a riflusso (1h)**

Hart, Craine.  
Laboratorio  
di Chimica  
Organica.  
Zanichelli,  
1998

## Parte A OSSIDAZIONE

Gli alcoli primari e secondari vengono ossidati dall'acido cromatico rispettivamente ad aldeidi e chetoni (vedi Esperimento 14, Parte D). In questo esperimento ossiderete un alcol secondario, il 9-idrossifluorene, al corrispondente chetone, il 9-fluorenone.



L'agente ossidante è una variante del reattivo di Bordwell-Wellman utilizzato nell'Esperimento 14. In questo esperimento l'anidride cromica ( $\text{CrO}_3$ ) è legata covalentemente ad una resina insolubile nel solvente di reazione. Il reagente solido può così essere rimosso facilmente per filtrazione, una volta che la reazione ha avuto luogo.

### ATTENZIONE

1. L'anidride cromica,  $\text{CrO}_3$ , è una sostanza altamente tossica e sospettata di essere cancerogena. Evitate il contatto della resina-anidride con la pelle.
2. Il diclorometano è una sostanza tossica ed irritante. Indossate i guanti, evitate il contatto con la pelle e non inalate i vapori.
3. Il toluene e l'esano sono infiammabili. Non si debbono accendere fiamme in laboratorio durante questo esperimento.

## OSSIDAZIONE DEGLI ALCOLI

AGENTE  
OSSIDANTE

Ipoclorito di sodio  
(CANDEGGINA)

*Solvent free*  
 $\text{KMnO}_4/\text{CuSO}_4$

**TEMPO**-catalizzata  
in solventi organici  
«alternativi»

Catalizzata  
dall'enzima **alcol  
deidrogenasi**

SUBSTRATO

cicloesano

cicloesano

ottano

etanolo

CONTESTO  
GREEN

Impiego di un agente  
ossidante più green

Eliminazione del  
solvente dalla sintesi

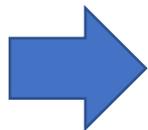
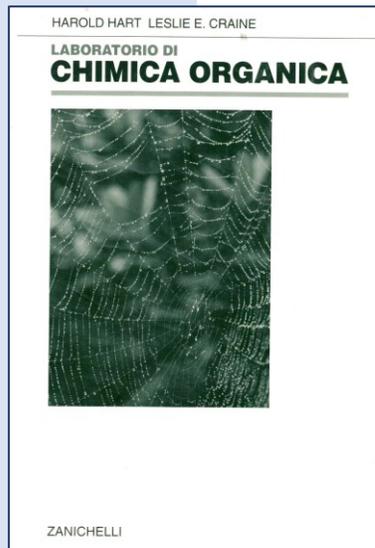
Impiego di un agente  
ossidante più green ed  
uso di un catalizzatore  
in solventi alternativi

Impiego di un agente  
ossidante più green e  
utilizzo di un enzima  
(solvente acquoso)

*SCALA MICRO*  
*SCOPO ANALITICO*



# Ossidazione degli alcoli nel ... 2022



Nell'ultima edizione di «*Laboratorio di chimica organica*» (Zanichelli) la stessa sintesi viene riproposta sostituendo l'anidride cromica con la **candeggina commerciale** (ipoclorito di sodio)

*Quali principi sono rispettati?*



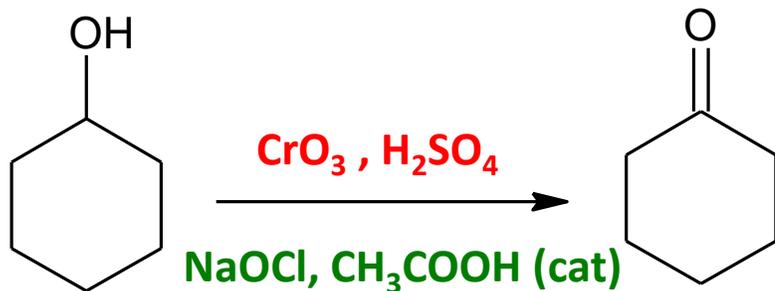
## SINTESI CHIMICHE PIU' SICURE

Sostituisco una sostanza ad elevata tossicità ( $\text{CrO}_3$ ) con una sostanza a minore tossicità



## CHIMICA INTRINSECAMENTE PIU' SICURA

Le sostanze scelte riducono il rischio di incidenti di natura chimica e sono meno impattanti per l'ambiente, anche per quanto riguarda lo smaltimento dei rifiuti



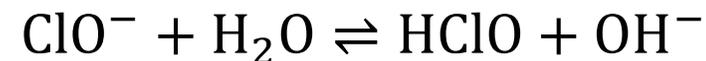
# Ossidazione con candeggina



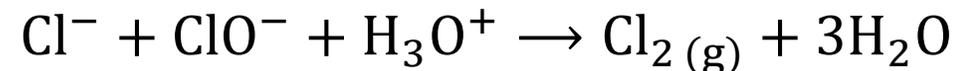
L'ipoclorito di sodio (**NaClO**) è il sale di sodio dell'acido ipocloroso (**HClO**). E' commercializzata in soluzione acquosa con concentrazioni variabili da 1% - 25% di colore giallo paglierino e odore penetrante

La CANDEGGINA (o varechina) è una soluzione acquosa 5-10% di **NaClO** stabilizzata tramite aggiunta di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

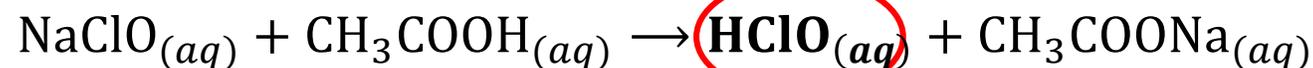
L'ipoclorito dà luogo a soluzioni basiche a causa della reazione di idrolisi



In ambiente acido gli ioni ipoclorito e in presenza di ioni cloruro dà luogo alla reazione di simproporzione

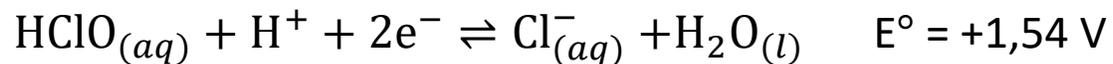
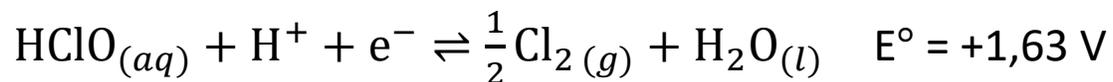
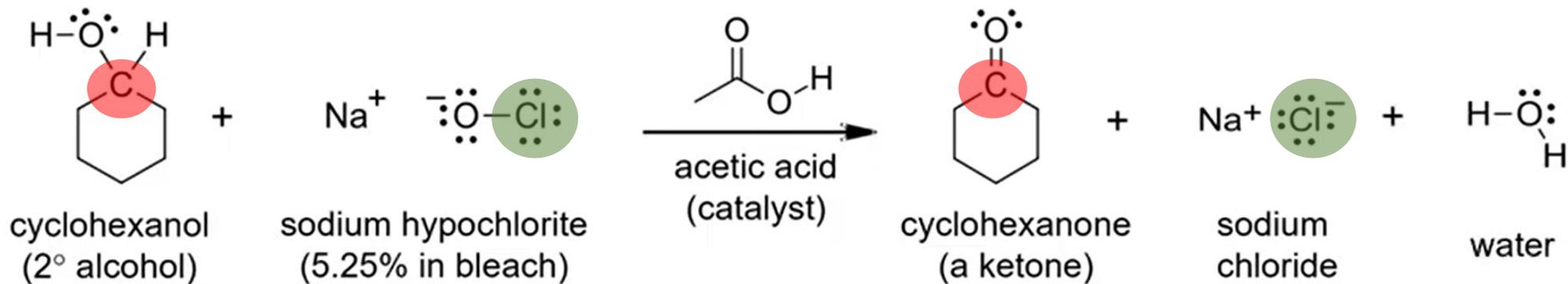


Il reagente ossidante **HClO** viene ottenuto *in situ* mediante mescolamento tra **candeggina** e **acido acetico** (che funge anche da catalizzatore della reazione)





# Ossidazione con candeggina



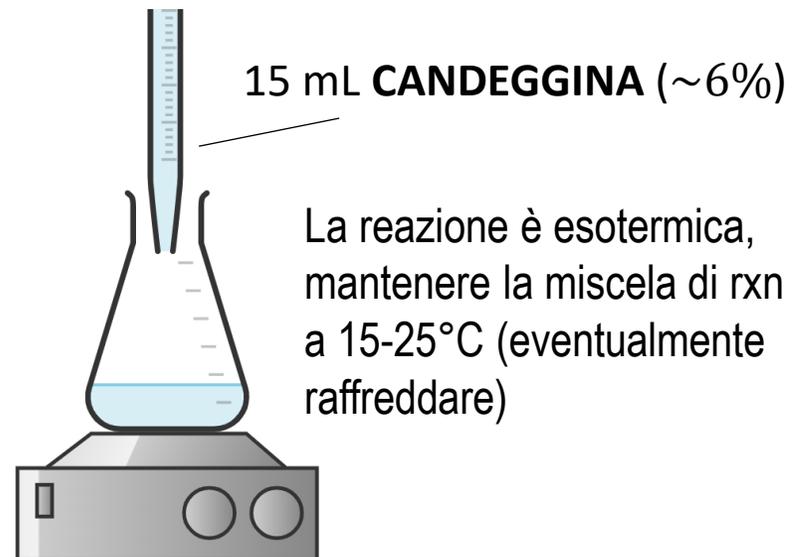
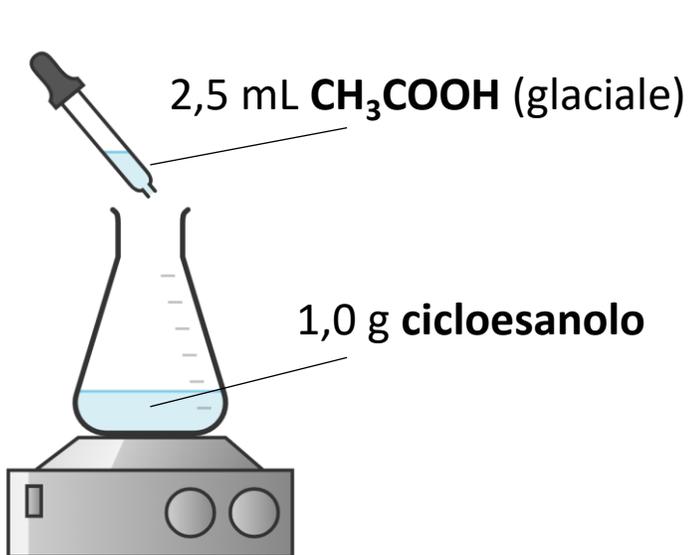
La reazione permette di ottenere **ottime rese per gli alcoli secondari** ma non è adatta all'ossidazione di alcoli primari in quanto porta a sottoprodotti indesiderati (es. esteri dimerici)

## Collegamento con chimica analitica

Per conoscere il titolo esatto della candeggina che stiamo usando è possibile effettuare una **titolazione iodometrica** facendo sviluppare iodio mediante trattamento del campione con KI e titolando lo iodio sviluppato con tiosolfato di sodio, utilizzando la salda d'amido come indicatore.

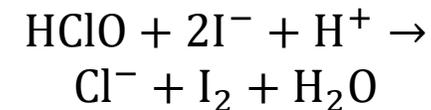
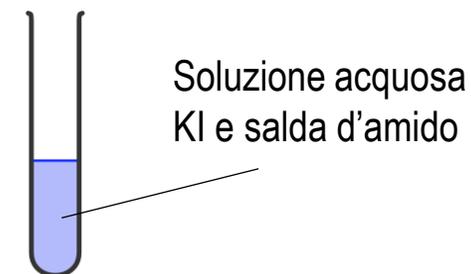


# Ossidazione con candeggina

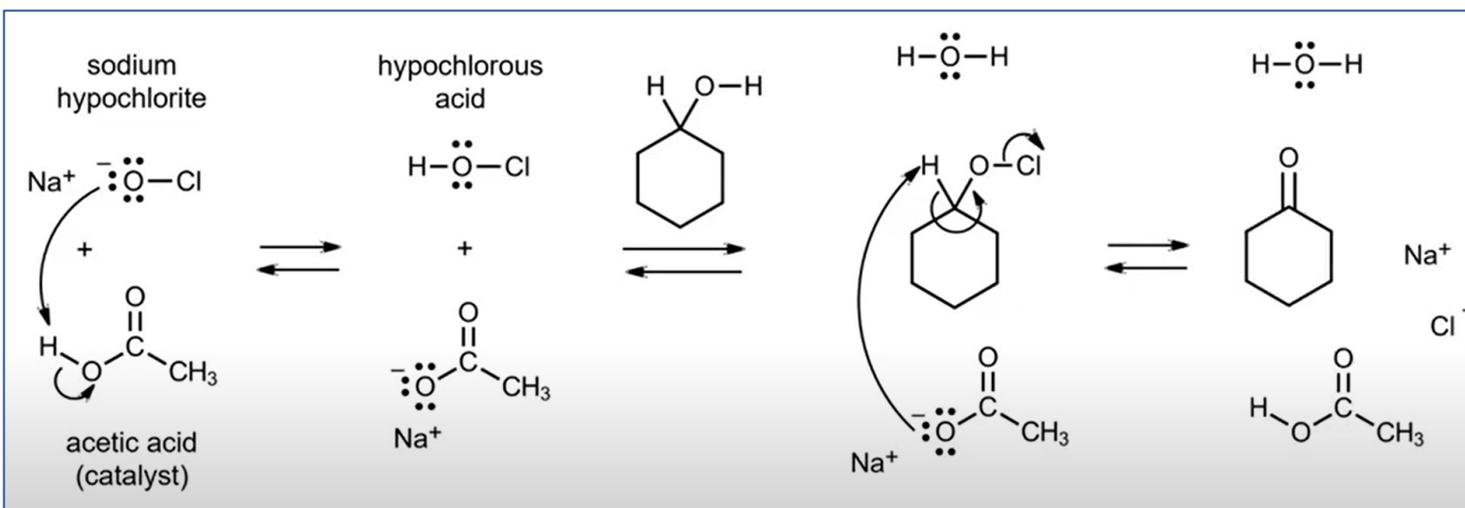


Si consiglia di utilizzare un eccesso in moli di NaOCl di 1,2.

Terminata l'aggiunta del reattivo controllare che sia presente HClO



Si forma il complesso blu iodio-salda d'amido (test positivo)



SCHEDA



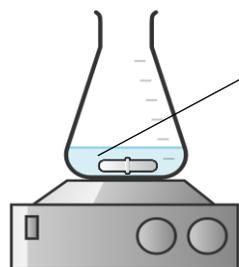
*J. Org. Chem.*  
1980, 45,  
2030-32

[DOI](#)

YouTube

[Link video](#)

# Ossidazione con candeggina



*Cosa è presente al termine della reazione?*

Eccesso di  
**HClO**

Distruggiamo l'eccesso di ossidante con aggiunta di bisolfito  $\text{NaHSO}_3$

**Acido acetico**  
(catalizzatore)

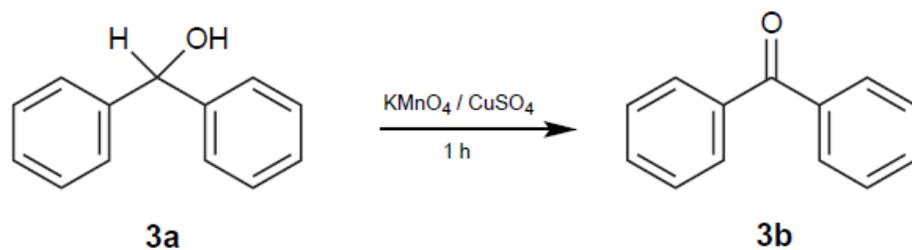
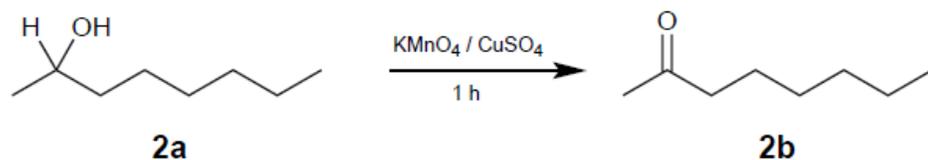
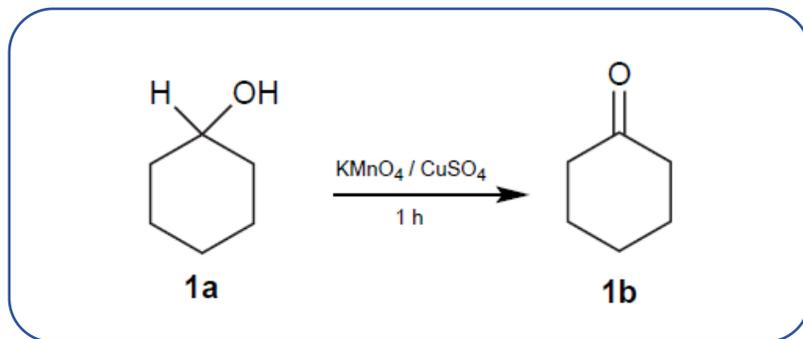
Neutralizzare con  $\text{NaOH}$  (al viraggio della cartina indicatrice universale)

Il prodotto viene poi estratto con solvente organico (diclorometano o etere dietilico) e anidrificato con solfato di sodio anidro.

*Spunti di riflessione...*

- **Reazioni redox** (chi è l'ossidante / riducente, elettroni scambiati, numeri di ossidazione)
- Comprensione del **meccanismo** (semplice) che prevede anche la presenza di un catalizzatore acido
- Ripasso di concetti di **chimica analitica** (titolazione sodio ipoclorito, test con  $\text{I}_2$  e salda d'amido per controllare avanzamento della reazione)
- **Separazione e purificazione** del prodotto finale
- **Caratterizzazione** del prodotto

# Ossidazione «*solvent free*»



Un alcol secondario viene ossidato a chetone operando in assenza di solvente. Si impiega direttamente una miscela ossidante solida di  $\text{KMnO}_4/\text{CuSO}_4$  operando a riflusso per 10-15 min.



## PREVENZIONE

Prevegno la generazione di rifiuti eliminando il solvente (*valutare smaltimento della miscela ossidante solida ...*)



## SINTESI CHIMICHE PIU' SICURE

Sostituisco una sostanza ad elevata tossicità ( $\text{CrO}_3$ ) con una sostanze a minore tossicità ( $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ )

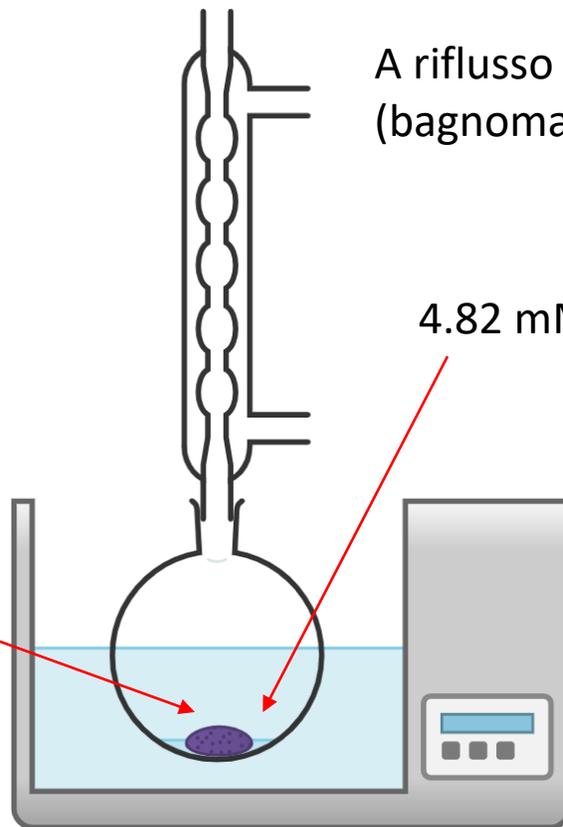
Dal punto di vista didattico è molto interessante osservare la **reazione** avvenire in **fase eterogenea!**

# Ossidazione «*solvent free*»



Miscela ossidante solida

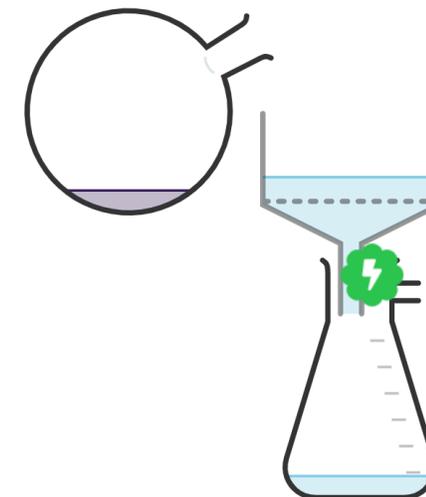
- 10 mM  $\text{KMnO}_4$
- 10 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



A riflusso per 1h  
(bagnomaria 100°C)

4.82 mM **ALCOL**

Lavaggio con esano  
(desorbimento prodotto) e  
filtrazione su Buckner



- Il prodotto viene raccolto dopo aver essiccato l'estratto con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e lasciato evaporare l'esano
- Semplice caratterizzazione TLC su gel di silice (eluente 5:1 esano / acetato di etile)

SCHEDA

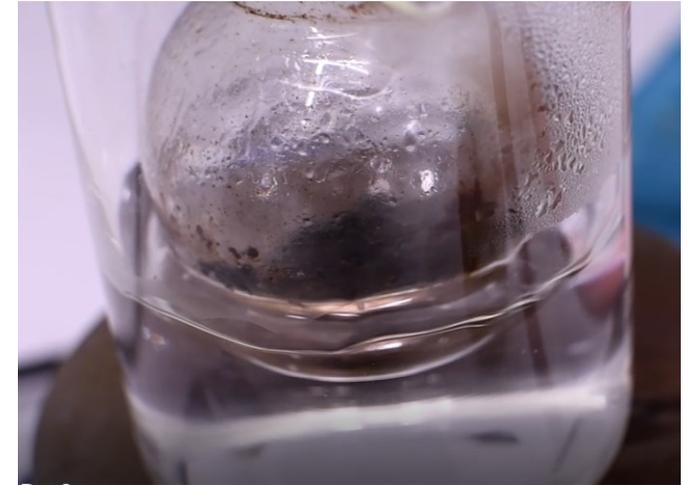


# Come fare ad ossidare gli alcoli primari?

Preparazione della  
miscela ossidante solida



Reazione con  
l'alcol primario



Miscela ossidante esausta

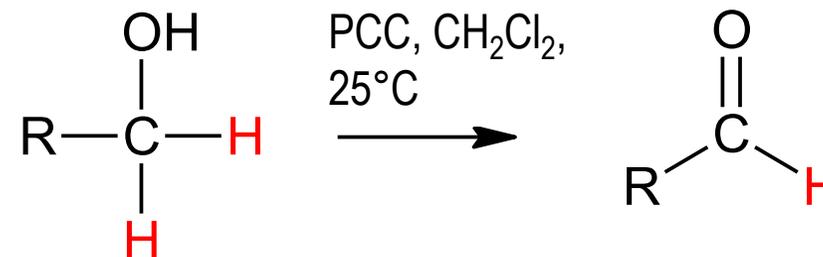


VIDEOLAB

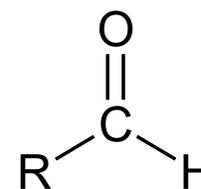
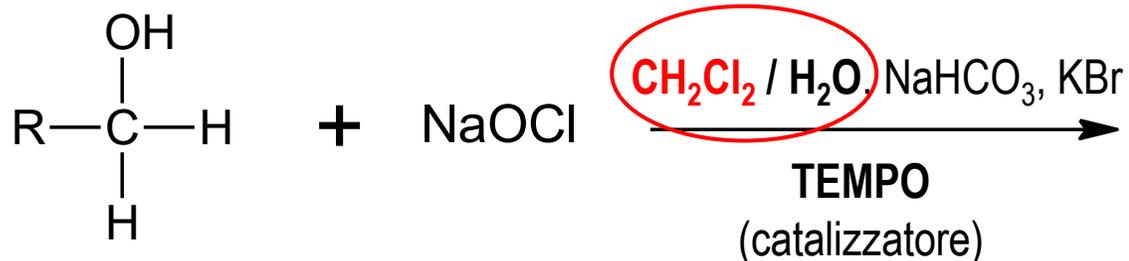


# Come fare ad ossidare gli alcoli primari?

- Negli alcoli primari, per interrompere l'ossidazione allo stadio di aldeide si impiegano reagenti particolari come il clorocromato di piridinio (**PCC**)
- Non è utile utilizzare **NaOCl** come ossidante in quanto si formano sottoprodotti indesiderati e le rese non sono buone



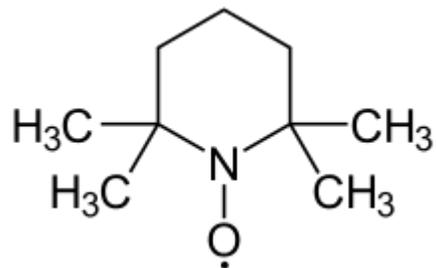
Proviamo a sfruttare ancora un ossidante «green» come l'ipoclorito di sodio, ma utilizziamo un **catalizzatore** per rendere la reazione più selettiva



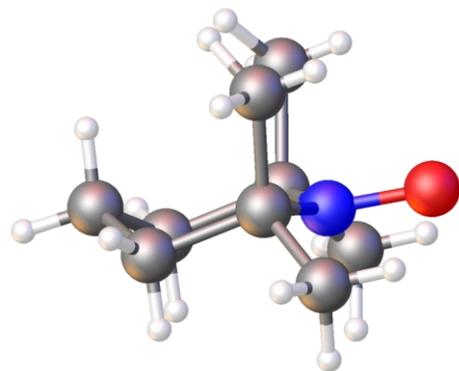
La sintesi originale prevede l'impiego di un **sistema bifasico** e l'uso di un **catalizzatore**



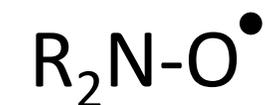
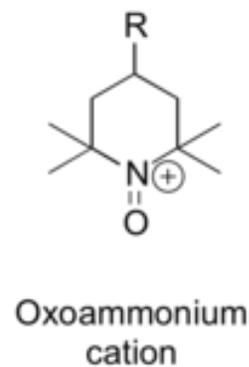
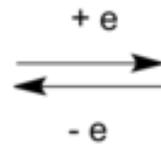
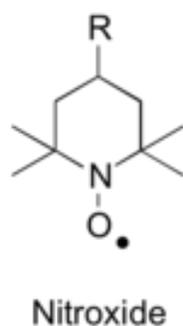
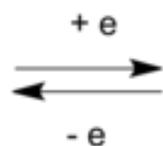
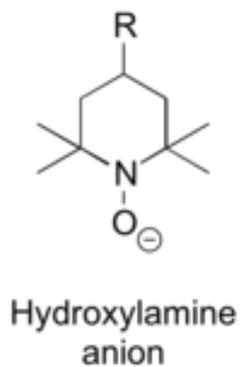
# Ossidazione TEMPO-catalizzata



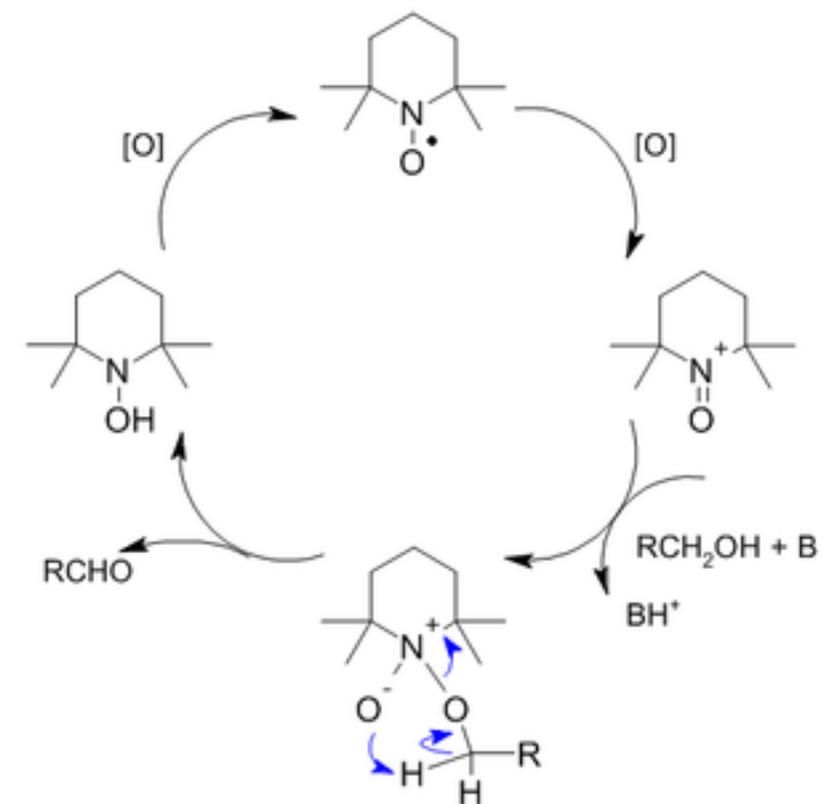
Il (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl, conosciuto comunemente come **TEMPO** è un **radicale stabile amminossilico**



E' utilizzato nelle sintesi organiche come **catalizzatore** per l'**ossidazione di alcoli primari ad aldeidi**



*CICLO CATALITICO SEMPLIFICATO*



## Oxidation Reactions

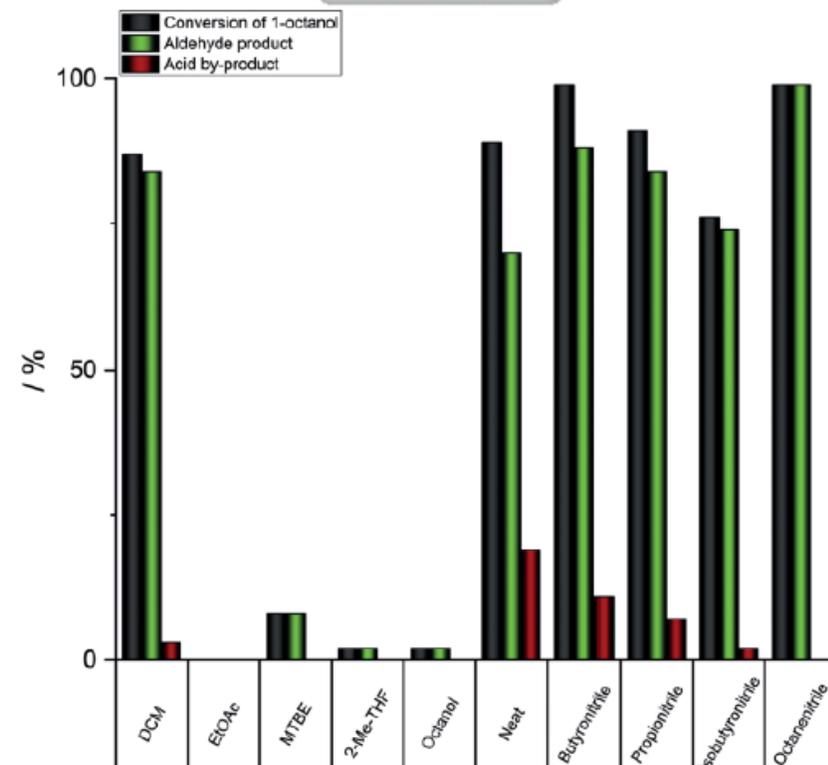
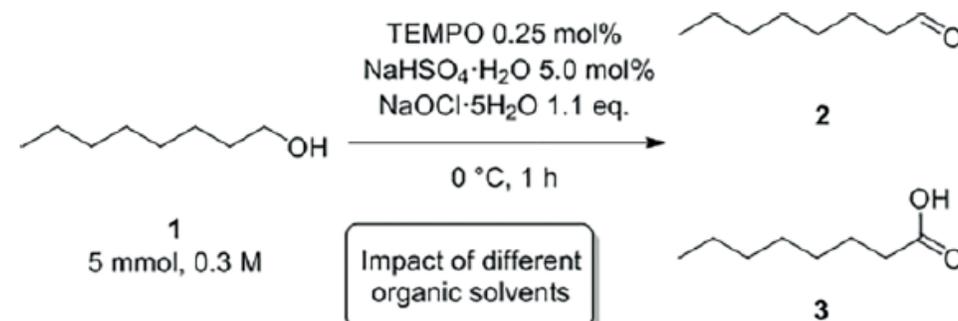
### Selective TEMPO-Oxidation of Alcohols to Aldehydes in Alternative Organic Solvents

Alessa Hinzmann,<sup>[a]</sup> Michael Stricker,<sup>[a]</sup> Jasmin Busch,<sup>[a]</sup> Sylvia Glinski,<sup>[a]</sup> Keiko Oike,<sup>[a]</sup> and Harald Gröger\*<sup>[a]</sup>

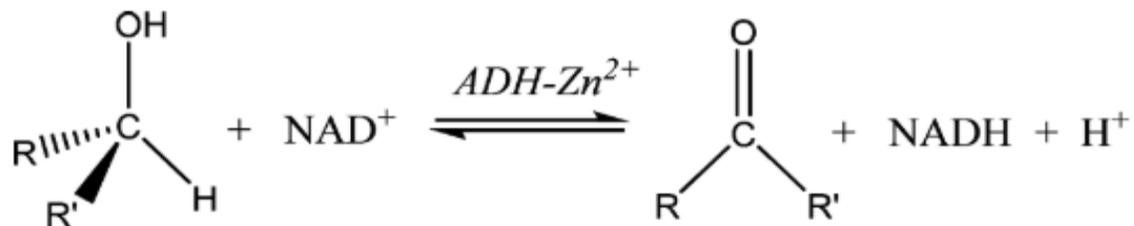
**Optimization in Terms of Solvent:** NaHSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.22 mmol, 31.1 mg, 5 mol-%) was suspended in organic solvent (15 mL) and cooled to 0 °C. Sodium hypochlorite pentahydrate (0.81 g, 5 mmol, 1.1 equiv.) and TEMPO (0.0075 mmol, 1.2 mg, 0.25 mol-%) were added. *n*-Octan-1-ol (**1**) (0.80 mL, 5 mmol, 0.3 M) was added under vigorous stirring and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h. Reaction progress was monitored by GC. The results of the optimization study are shown in the Supporting Information (Table S5) and in the publication (Figure 1).

Table 1. Optimized reaction parameters for the oxidation of *n*-octan-1-ol (**1**) and *n*-decan-1-ol (**4**).

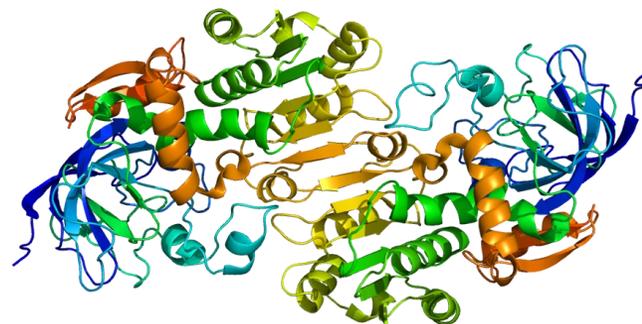
	<i>n</i> -Octan-1-ol ( <b>1</b> )	<i>n</i> -Decan-1-ol ( <b>4</b> )
Substrate concentration	1 M	1 M
TEMPO	0.25 mol-%	0.25 mol-%
NaHSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5 mol-%	5 mol-%
NaOCl·5H <sub>2</sub> O	1.1 eq	1.0 eq



# Ossidazione con enzima ADH



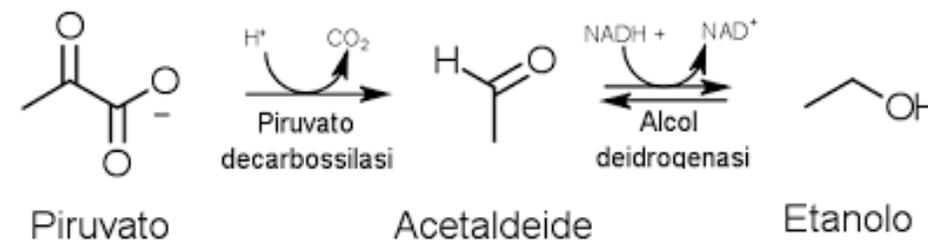
La **alcol deidrogenasi (ADH)** è un **enzima** appartenente alla classe delle **ossidoreduttasi**, che catalizza la reazione di ossidazione degli alcoli



**RUOLO METABOLICO**  
(uomo e altri animali)

**Catalisi dell'etanolo** (e metanolo). Trasforma il metanolo in acetaldeide (successivamente rapidamente convertito in acido acetico che entra nel ciclo di Krebs) eliminando così l'etanolo, una molecola tossica per l'organismo in quanto compromette le funzioni del sistema nervoso

**RUOLO CHIAVE NELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA**  
(es. nei lieviti)



Produzione biotecnologica di etanolo

[PDB: ADH5](#)  
Struttura  
3D enzima

in Catalysis

REVIEW  
published: 10 May 2022  
doi: 10.3389/ctls.2022.900554

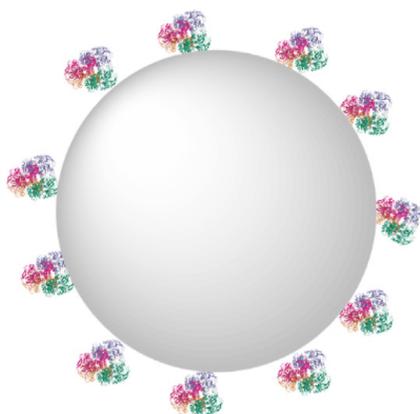


## Alcohol Dehydrogenases as Catalysts in Organic Synthesis

Amanda Silva de Miranda<sup>1\*</sup>, Cintia D. F. Milagre<sup>2\*</sup> and Frank Hollmann<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais—UFMG, Belo Horizonte, Brazil, <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Organic Chemistry, Institute of Chemistry, UNESP—São Paulo State University, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup>Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Delft, Netherlands

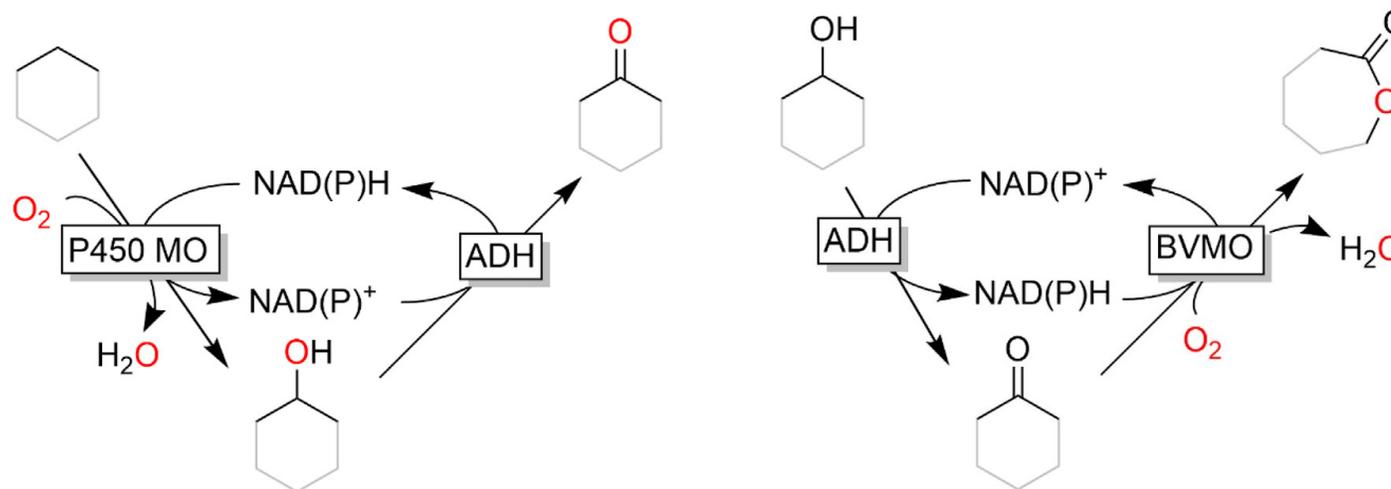
Alcohol dehydrogenases (ADHs) have become important catalysts for stereoselective oxidation and reduction reactions of alcohols, aldehydes and ketones. The aim of this contribution is to provide the reader with a timely update on the state-of-the-art of ADH-catalysis. Mechanistic basics are presented together with practical information about the use of ADHs. Current concepts of ADH engineering and ADH reactions are critically discussed. Finally, this contribution highlights some prominent examples and future-pointing concepts.



Front. Catal.  
2022, 2, 1-32

## E' possibile utilizzare l'alcol deidrogenasi come catalizzatore per le sintesi organiche?

- **Costo** per la produzione dell'enzima (10000-250 € /kg – a seconda della scala di produzione e del grado di purezza)
- Immobilizzazione dell'enzima (rendere la **catalisi eterogenea** per permettere il recupero del catalizzatore)
- **Costo del cofattore** (NAD – NADP) è conveniente utilizzare tecniche di rigenerazione del cofattore



## *Considerazioni ambientali*

**Le reazioni biocatalitiche sono spesso identificate come «green»**

- Gli enzimi sono sostanze bio-based e sono biodegradabili vs **metalli di transizione come catalizzatori**
- Condizioni di reazione sono in genere più blande (temperature basse) vs **alte temperature**
- Utilizzo di solventi acquosi vs **solventi organici**



***... tuttavia queste sono considerazioni troppo superficiali!***

***Una reazione chimica non diventa automaticamente «green» solo per il fatto che stiamo utilizzando un catalizzatore enzimatico!***

La produzione di enzimi **consuma risorse** e anche le reazioni biocatalitiche **generano rifiuti**

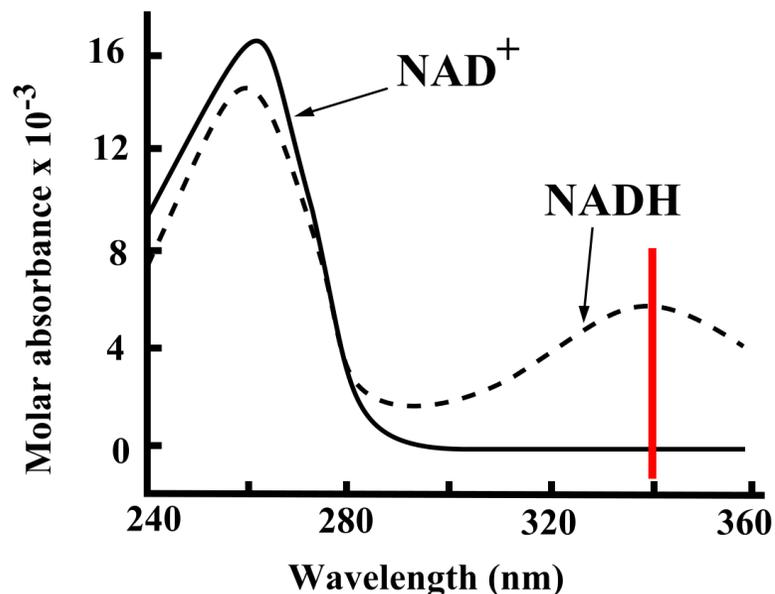
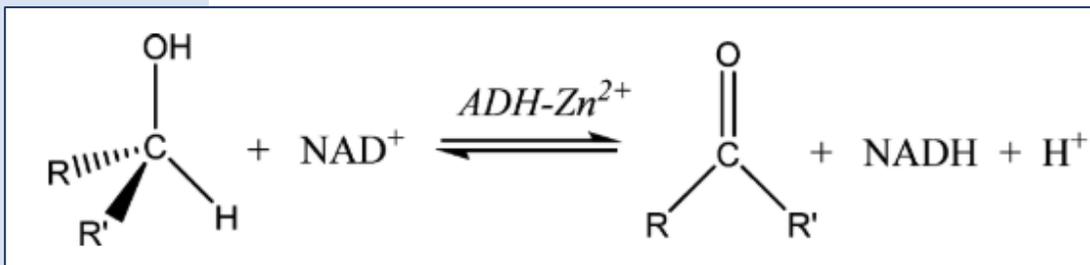
Vi sono **consumi di energia** dovuti a scambi termici, trasporto di materia negli impianti, sistemi di agitazione

L'impatto ambientale va valutato sull'**intera filiera produttiva**: dalle materie prime al prodotto finale in un ottica di *Life Cycle Assessments*

L'acqua è un solvente «green», ma se contiene **agenti contaminanti** che non possono essere depositati nell'ambiente va comunque trattata come **rifiuto**

La valutazione dell'impatto ambientale di percorsi sintetici diversi andrebbe fatta utilizzando le metriche tipo **E-factor** (e suoi derivati) può aiutare a rivelare le problematiche reali di una data reazione (e non solo quelle percepite) e può servire da guida per pianificare nuovi esperimenti

# Ossidazione con ADH



L'enzima **alcol deidrogenasi** catalizza la reazione di ossidazione degli alcoli a chetoni o aldeidi utilizzando come co-substrato il  $\text{NAD}^+$

La formazione del composto carbonilico può essere seguita in modo indiretto misurando l'assorbanza del  $\text{NADH}$  nella regione dell'UV ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

## Quali vantaggi?

- ✓ Reagenti non pericolosi
- ✓ Possibilità di **studiare la cinetica dell'enzima** (es. costruire le curve di *Michaelis-Menten*)
- ✓ Utilizzare la reazione a **scopo analitico** per la determinazione dell'etanolo in campioni incogniti

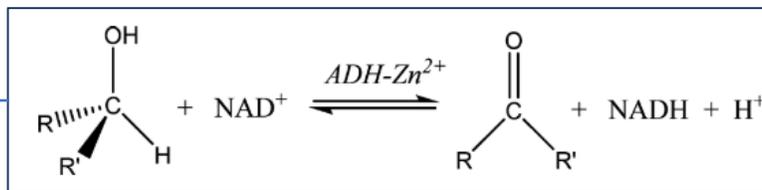
Substance	Approximate Reactivity (%)
Ethanol	100
<i>n</i> -Butanol	40
Isopropanol	8
Methanol	0
Ethylene glycol	1
Acetone	0



# Ossidazione con ADH

Curr. Chem. Lett.  
2015, 4, 77-84

J. Chem. Edu.  
2016, 93, 963-970



## Determinazione analitica dell'etanolo

## Studio della cinetica enzimatica

### NAD-ADH Reagent Multiple Test Vial

Vial da 16 mL (5 test per vial) già contenenti i reattivi dosati (NAD<sup>+</sup> e ADH). Necessario solo preparare un tampone di glicina/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a pH 9

Test già pronti adatti per l'analisi su siero, plasma e urine senza ulteriore pre-trattamento del campione

471€

N7160 ▶ Signa-Aldrich  
**NAD-ADH Reagent Multiple Test Vial**  
for alcohol determination  
SKU: N7160-10X16ML  
Taglio della confezione: 10 X 16 ML  
Disponibilità: Spedizione prevista il 21 ottobre 2022 Dettagli...  
Prezzo: 471,00 €

### Metodica validata

Acquisto separato dei singoli reattivi e preparazione delle soluzioni

- NAD<sup>+</sup> (16 mg/mL)
- Tampone con semicarbazide\* glicina / Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / semicarbazide a pH 8.7
- Soluzione acquosa dell'enzima (con attività 4000 unità/mL nel campione finale – *va bene anche meno*)

\* La semicarbazide reagisce con l'aldeide e trascina l'equilibrio verso i prodotti rendendo irreversibile la reazione

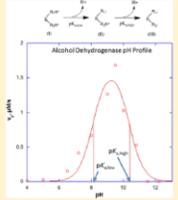
JOURNAL OF CHEMICAL EDUCATION Laboratory Experiment  
pubs.acs.org/jchemeduc

**The Alcohol Dehydrogenase Kinetics Laboratory: Enhanced Data Analysis and Student-Designed Mini-Projects**  
Todd P. Silverstein\*

Department of Chemistry, Willamette University, Salem, Oregon 97301, United States

Supporting Information

ABSTRACT: A highly instructive, wide-ranging laboratory project in which students study the effects of various parameters on the enzymatic activity of alcohol dehydrogenase has been adapted for the upper-division biochemistry and physical biochemistry laboratory. Our two main goals were to provide enhanced data analysis, featuring nonlinear regression, and also to give students experience in experimental design. Students use appropriate kinetic and thermodynamic equations to fit their data from Michaelis–Menten plots, enzyme activity pH profiles, inhibitor and denaturant concentration profiles, and temperature-dependence plots. Experiments at the end of this project are designed and implemented by student pairs, thus preparing them for independent research.



KEYWORDS: Upper-Division Undergraduate, Biochemistry, Enzymes, Kinetics, UV-Vis Spectroscopy, Undergraduate Research

- Costruzione della curva di *Michaelis-Menten*
- Studio dell'effetto della variazione dei parametri (pH, temperatura, effetto di un inibitore) sull'attività dell'enzima.



VII Scuola  
Nazionale di  
Didattica  
della  
Chimica  
«G. Del Re»

*La chimica  
per uno  
sviluppo  
sostenibile e  
l'educazione  
civica*

Bertinoro  
6-9  
Settembre  
2022

*Grazie per  
l'attenzione!*