



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS



MONOGRAFIA

Pedro Nascimento Casimiro

Experimento de biocatálise para a graduação - Redução de compostos carbonilados com fermento de pão

Monografia apresentada junto ao Curso de Graduação do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título **Bacharelado em Química**.

Aluno: Pedro Nascimento Casimiro

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto (IQSC)

Banca:

Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro (IQSC)

Profa. Dra. Marcia Nitschke (IQSC)

São Carlos, 14 de julho de 2023

Agradecimentos

Eu, Pedro Nascimento Casimiro, gostaria de agradecer todos aqueles que me incentivaram, me apoiaram, e especialmente, aqueles que me ajudaram no desenvolvimento de meu trabalho de conclusão do curso de Química Bacharelado da Universidade de São Paulo no Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

Fazem parte dessa equipe a quem dedico meus agradecimentos, em especial, o meu orientador de trabalho André Luiz Meleiro Porto, que me acompanhou e me auxiliou a todo momento, desde o início do projeto.

Também agradeço ao pessoal do laboratório que trabalhei por me auxiliarem nas operações de laboratório. Estes são: Samuel e David, que dedicaram seus tempos me auxiliando nas técnicas de análise e identificação dos componentes de interesse de meu projeto.

Também sou grato à Juliana, Letícia, Lígia, Brízia e a Marília pelo guia que me deram durante a realização dos procedimentos práticos.

Por fim, também sou grato à minha família pelo incentivo e apoio que me deram e dão na realização das atividades de meu curso.

Todas as pessoas a quem agradeço fizeram parte da minha jornada no desenvolvimento deste trabalho que foi um pequeno passo na evolução de meu curso, mas um grande passo na evolução de minha aprendizagem em trabalhar com mais autonomia em laboratório.

Pedro Nascimento Casimiro

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. (A) Gráfico da energia livre de Gibbs de uma reação (bio)química não catalisada e catalisada. (B) Gráficos de uma reação endotérmica e de uma reação exotérmica..... | 12 |
| Figura 2. Representação esquemática do mecanismo para uma reação enzimática. (A) Modelo chave-fechadura. (B) Modelo do encaixe-induzido..... | 14 |
| Figura 3. Redução da acetofenona com boro-hidreto de sódio e cenoura..... | 17 |
| Figura 4. (A) Levedura unicelular. (B) Reação geral de oxidação da glicose em etanol por <i>S. cerevisiae</i> | 18 |
| Figura 5. (A) Reação geral de um grupo carbonílico de cetona com a enzima álcool desidrogenase (ADH) e o cofator NADH. (B) Redução do piruvato a L-lactato com a enzima lactato desidrogenase (um tipo de ADH)..... | 19 |
| Figura 6. Representação geral do ciclo de redução de compostos carbonílicos e reciclo das coenzimas envolvendo as células da levedura <i>S. cerevisiae</i> | 20 |
| Figura 7. Fermento Biológico Biox utilizado nas reações de biocatálise..... | 22 |
| Figura 8. Placas de CCD das reações de redução da acetofenona com fermento de pão Biox reveladas em UV (254 nm). (A) 100 µL e (B) 200 µL..... | 25 |
| Figura 9. Placas de CCD das reações de redução da acetofenona (100 µL e 200 µL) com fermento de pão Biox após as extrações. (A) Reações reveladas na presença de luz UV a 254 nm. (B) Reações reveladas em solução ácida de <i>p</i> -anisaldeído..... | 27 |
| Figura 10. Placas de CCD das reações (segunda repetição) de redução da acetofenona (100 µL e 200 µL) com fermento de pão Biox antes das extrações reveladas na presença de luz UV a 254 nm. (A) 100 µL e (B) 200 µL..... | 28 |
| Figura 11. Placas de CCD da reação de redução da <i>p</i> -cloro-acetofenona com NaBH ₄ . (A) Reação revelada na presença de luz UV a 254 nm. (B) Reação revelada em solução ácida de <i>p</i> -anisaldeído..... | 30 |
| Figura 12. Placas de CCD das reações de redução da <i>p</i> -cloro-acetofenona (100 µL e 200 µL) com fermento de pão Biox antes das extrações. (A) Reação com 100 µL reveladas na presença de luz UV a 254 nm. (B) Reação com 100 µL reveladas na presença de luz UV a 254 nm..... | 31 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Mecanismo geral da redução de carbonilas (aldeídos e cetonas) com NaBH ₄ com a participação do íon sódio..... | 34 |
| Figura 14. Destaque para a transferência de hidreto à carbonila eletrofílica seguida da doação de um próton pelo solvente (água)..... | 35 |
| Figura 15. Trajetória Bürgi-Dunitz do nucleófilo para maximizar a superposição do HOMO do nucleófilo com o LUMO da ligação π^* (C=O) e minimizar a repulsão com a densidade eletrônica localizada no oxigênio (no orbital π de natureza ligante)..... | 36 |
| Figura 16. Adição de hidreto pelas faces <i>Si</i> e <i>Re</i> do grupo carbonílico pró-quiral (acetofenona e <i>p</i> -cloro-acetofenona)..... | 37 |
| Figura 17. Cromatogramas obtidos por CG-FID com coluna quiral de ciclodextrina. (A) Padrão da acetofenona. (B) Padrão do 1-fenil-etanol racêmico. (C) Reação de redução com fermento de pão Biox da acetofenona (100 μ L, 24 h, temperatura ambiente). (D) Reação de redução com fermento de pão Biox da acetofenona (200 μ L, 24 h, temperatura ambiente)..... | 41 |
| Figura 18. Cromatogramas obtidos por CG-FID com coluna quiral de ciclodextrina. (A) Padrão da <i>p</i> -cloro-acetofenona. (B) Padrão do <i>p</i> -cloro-1-fenil-etanol racêmico. (C) Reação de redução com fermento de pão Biox da <i>p</i> -cloro-acetofenona (100 μ L, 24 h, temperatura ambiente). (D) Reação de redução com fermento de pão da <i>p</i> -cloro-acetofenona (200 μ L, 24 h, temperatura ambiente)..... | 43 |
| Figura 19. (A) Cromatograma obtido por CG-EM da acetofenona. (B) Espectro de massas da acetofenona (IE, 70 eV)..... | 45 |
| Figura 20. (A) Cromatograma obtido por CG-EM da <i>p</i> -cloro-acetofenona. (B) Espectro de massas da <i>p</i> -cloro-acetofenona (IE, 70 eV)..... | 46 |
| Figura 21. (A) Cromatograma obtido por CG-EM do 1-fenil-etanol. (B) Espectro de massas do 1-fenil-etanol (IE, 70 eV)..... | 47 |
| Figura 22. (A) Cromatograma obtido por CG-EM do <i>p</i> -cloro-1-fenil-etanol. (B) Espectro de massas do <i>p</i> -cloro-1-fenil-etanol (IE, 70 eV)..... | 48 |
| Figura 23. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da acetofenona..... | 51 |
| Figura 24. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da acetofenona..... | 51 |
| Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da <i>p</i> -cloro-acetofenona..... | 53 |
| Figura 26. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da <i>p</i> -cloro-acetofenona..... | 53 |
| Figura 27. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do 1-fenil-etanol..... | 55 |
| Figura 28. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do 1-fenil-etanol..... | 55 |
| Figura 29. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do <i>p</i> -cloro-1-fenil-etanol..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do <i>p</i> -cloro-1-fenil-etanol..... | 57 |
| Figura 31. Espectro de infravermelho (filme) da acetofenona..... | 59 |
| Figura 32. Espectro de infravermelho (filme) da <i>p</i> -cloro-acetofenona..... | 60 |
| Figura 33. Espectro de infravermelho (filme) do 1-fenil-etanol..... | 61 |
| Figura 34. Espectro de infravermelho (filme) do <i>p</i> -cloro-1-fenil-etanol..... | 62 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Redução da acetofenona e <i>p</i> -cloroacetofenona com fermento de pão..... | 21 |
| Esquema 2. Redução da acetofenona com boro-hidreto de sódio em metanol..... | 23 |
| Esquema 3. Redução da <i>p</i> -cloro-acetofenona com boro-hidreto de sódio em metanol..... | 29 |
| Esquema 4. Algumas representações de estruturas de ressonância da acetofenona..... | 50 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Resumo | 10 |
| 1. Introdução | 11 |
| 1.1. Aspectos históricos e gerais de reações enzimáticas..... | 11 |
| 1.2. Em busca de reações sustentáveis..... | 15 |
| 1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fermento de pão)..... | 17 |
| 2. Objetivos | 21 |
| 3. Materiais e métodos | 22 |
| 3.1. Reagentes e solventes..... | 22 |
| 3.2 Redução da acetofenona com o boro-hidreto de sódio..... | 23 |
| 3.3 Reações de redução da acetofenona (100 µL e 200 µL) com o fermento biológico comercial Biox (fermento de pão)..... | 24 |
| 3.3.1 Extração das reações de redução da acetofenona (100 µL e 200 µL) com fermento de pão Biox..... | 26 |
| 3.3.2. Segunda repetição da reação de redução da acetofenona (100 µL e 200 µL) com fermento de pão Biox..... | 28 |
| 3.4 Redução da <i>p</i> -cloro-acetofenona com o boro-hidreto de sódio..... | 29 |
| 3.5 Reações de redução da <i>p</i> -cloro-acetofenona (100 µL e 200 µL) com o fermento biológico comercial Biox (fermento de pão)..... | 30 |
| 3.6 Análises por CG-FID, CG-EM, RMN e IV..... | 31 |
| 4. Resultados e Discussão | 33 |
| 4.1. Resultados da reação de redução da acetofenona e da <i>p</i> -cloro-acetofenona com boro-hidreto de sódio para a obtenção dos alcoóis racêmicos correspondentes..... | 33 |
| 4.2. Redução da acetofenona e da <i>p</i> -cloroacetofenona na presença de células vivas <i>S. cerevisiae</i> (fermento de pão Biox) utilizando 100 e 200 µL..... | 37 |
| 4.3. Caracterização dos reagentes (cetonas) e produtos (alcoóis) por Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹ H e ¹³ C) e Infravermelho (IV)..... | 44 |
| 4.3.1. Caracterização por CG-EM..... | 44 |
| a) Acetofenona..... | 44 |
| b) <i>p</i> -Cloro-acetofenona..... | 45 |
| c) 1-Fenil-etanol ou metilfenil carbinol..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| d) <i>p</i> -Cloro-1-fenil-etanol..... | 47 |
| 4.3.2. Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C | 49 |
| a) Acetofenona..... | 49 |
| b) <i>p</i> -Cloro-acetofenona..... | 52 |
| c) 1-Fenil-etanol ou metilfenil carbinol..... | 53 |
| d) <i>p</i> -Cloro-1-fenil-etanol..... | 55 |
| 4.3.3. Caracterização por Infravermelho (IV)..... | 58 |
| a) Acetofenona..... | 58 |
| b) <i>p</i> -Cloro-acetofenona..... | 59 |
| c) 1-Fenil-etanol ou metilfenil carbinol..... | 60 |
| d) <i>p</i> -Cloro-1-fenil-etanol..... | 61 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 63 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 64 |
| 7. ANEXO..... | 65 |

RESUMO

Um dos organismos que podem realizar catálise de reações bioquímicas enzimáticas é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja aplicabilidade principal se destaca na produção de etanol, pães, queijos e cervejas. Esse microrganismo tem a capacidade de realizar a redução de compostos orgânicos carbonilados, gerando produtos reduzidos que são enantiomericamente puros ou enriquecidos, já que levam a formação preferencial de apenas um dos enantiômeros do produto; algo que não ocorre com muitos catalisadores químicos convencionais. Daí a grande vantagem na utilização de catalisadores enzimáticos na Química de forma geral. Além da estereosseletividade, as reações químicas catalisadas biologicamente não geram subprodutos ou resíduos tóxicos ao meio ambiente e demais seres vivos, dispensam matérias-primas esgotáveis da natureza, entre outras vantagens que reforçam seu crescente uso na área industrial e acadêmica. O objetivo deste estudo foi realizar a redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão comercial (Biox). A redução biocatalítica com fermento de pão Biox com 100 µL de acetofenona apresentou uma conversão de 97% e obteve-se um valor de e.e. = 32% para o álcool (+)-(*R*)-1-fenil-etanol. Enquanto que a reação de redução com 200 µL de acetofenona com fermento de pão Biox, forneceu uma conversão de 93% e obteve-se um valor de e.e. = 44% para o álcool (+)-(*R*)-1-fenil-etanol. A reação de redução da acetofenona com 200 µL com o fermento de pão Biox, apresentou um valor de excesso enantiomérico (e.e. = 44%) um pouco melhor que a reação com 100 µL (e.e. = 32%). Ainda, a reação foi realizada com o dobro de massa de acetofenona e a conversão também foi bastante significativa (c = 93%). A reação de redução com 100 µL da *p*-cloro-acetofenona forneceu o correspondente *p*-cloro-1-fenil-etanol com 80% de conversão e um excesso enantiomérico de e.e. = 64%. Enquanto que a reação com 200 µL de *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão Biox forneceu o correspondente *p*-cloro-1-fenil-etanol com 35% de conversão e um excesso enantiomérico de e.e. = 74%. Neste caso, quando dobrou a quantidade da *p*-cloro-acetofenona de 100 µL para 200 µL, ocorreu um decréscimo significativo da conversão. E, em relação a configuração absoluta (*R* ou *S*) ainda não foi determinada para o *p*-cloro-1-fenil-etanol. Contudo, destaca-se que enantiômero majoritário da redução da acetofenona, foi o oposto na redução com a *p*-cloro-acetofenona com o fermento de pão Biox, inferindo-se que estes álcoois têm configurações absolutas opostas. Este estudo de redução biocatalítica da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão Biox teve como proposta a elaboração de uma prática que foi aplicada na aula de ensino de laboratório de Química Orgânica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos históricos e gerais de reações enzimáticas

As reações químicas promovidas por agentes biológicos, especialmente por microrganismos (biotransformações químicas) são utilizadas pela humanidade desde a antiguidade. Documentos históricos relatam o uso da fermentação alcoólica da uva e o preparo de cerveja e pão pelas civilizações egípcias e mesopotâmicas. Nestes casos, o entendimento da natureza de tais transformações cientificamente estão diretamente associadas às enzimas produzidas por microrganismos.¹⁻²

Assim, as enzimas foram descobertas no século XIX por Louis Pasteur (França) quando estudava a fermentação do açúcar em álcool pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Pasteur postulou que esses fermentos (as enzimas) eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo (microrganismos). O termo "enzima" foi usado pela primeira vez por Wilhelm Kühne (1878) para descrever este fermento, no sentido de "levedar" ou fermentar. O termo enzima passou a ser usado apenas para as proteínas com capacidade catalítica, enquanto que o termo "fermento" se refere à atividade exercida por organismos vivos.³⁻⁴

Uma substância que tem a capacidade de acelerar, ou seja, tornar mais rápida uma reação química, e que não seja a espécie reagente, é denominada de catalisador. As reações (bio)químicas que ocorrem nos sistemas biológicos em organismos vivos, intracelular ou extracelularmente são catalisadas por enzimas **(Figura 1A)**.⁵

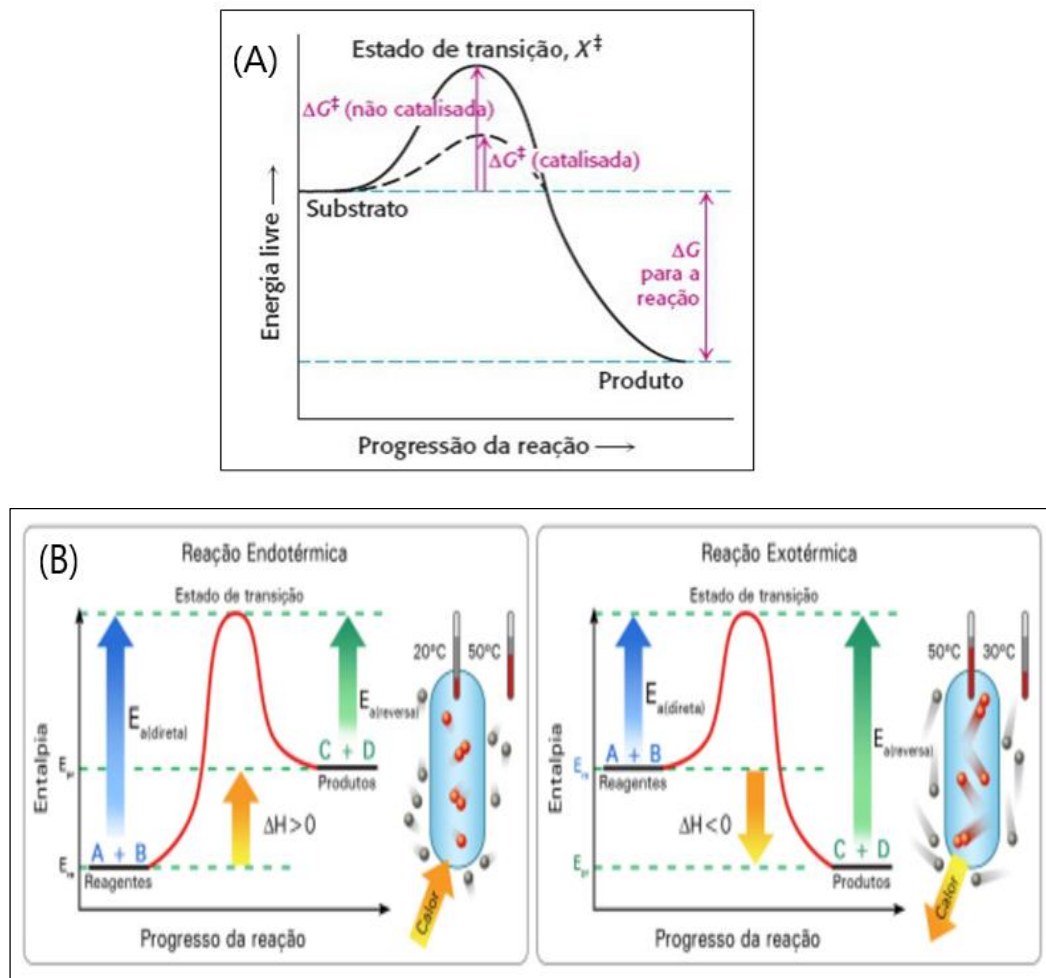
Desta forma, as enzimas mudam o caminho de uma reação (bio)química para um trajeto que exige menor energia de ativação. As enzimas ligam-se por interações ou forças intermoleculares (ligação de hidrogênio, ligação dipolo-dipolo permanente, ligação dipolo-dipolo induzido ou forças de van der Waals) às moléculas dos reagentes e "segurando-as" de uma forma que os processos de quebra de ligações, bem como a formação de novas ligações químicas ocorram mais rapidamente.⁵

Contudo, deve-se destacar um ponto muito relevante é que as enzimas não alteram o valor da variação da energia Livre de Gibbs (ΔG) de uma reação (bio)química. Assim, as enzimas não mudam o fato de a reação liberar energia (endotérmica) ou absorver energia (exotérmica) durante o processo de transformação

dos reagentes em produtos. Isso ocorre porque as enzimas não afetam a energia livre dos reagentes ou dos produtos (**Figura 1A-B**).⁵

Nas reações (bio)químicas as enzimas simplesmente baixam a energia do estado de transição, ou seja, a energia de ativação, um estado instável pelo qual os produtos devem passar para que se tornem reagentes durante o processo. O estado de transição está no topo da "montanha" de energia como mostrado na **Figura 1A**. Porém, para qualquer reação (bio)química ocorrer é necessário oferecer uma quantidade mínima de energia, para romper as ligações químicas dos reagentes. Finalmente, após atingir o estado de transição, se as condições forem favoráveis a reação se completa liberando o produto para o meio reacional.⁵

Figura 1 - (A) Gráfico da energia livre de Gibbs de uma reação (bio)química não catalisada e catalisada. (B) Gráficos de uma reação endotérmica e de uma reação exotérmica.



Fonte: (A) <https://edisciplinas.usp.br/>
 (B) https://midia.atp.usp.br/plc/plc0013/impressos/plc0013_08.pdf

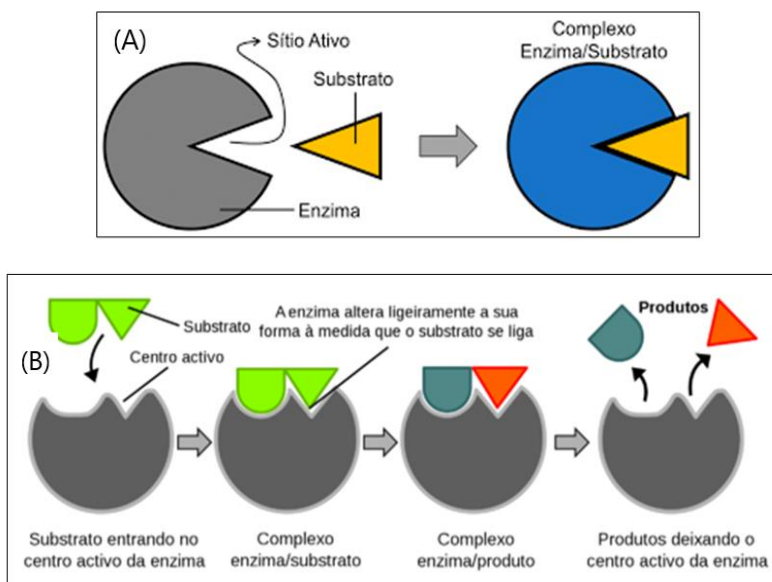
Em relação às reações enzimáticas bioquímicas, no final do século XIX, foi idealizado por Emil Fischer (1894) a criação do tradicional modelo “chave e fechadura” para explicar a ação específica das enzimas com os respectivos substratos (**Figura 2A**). Embora este modelo fosse interessante, devido a garantia da especificidade, caiu em desuso, pois traz a ideia que o sítio ativo da enzima seja sempre rígido.⁵

No modelo idealizado por Fischer, a enzima e o substrato deveriam apresentar uma complementaridade bastante rígida, não havendo flexibilidade entre as espécies envolvidas. Contudo, o substrato (e o próprio produto), bem como a enzima, mais precisamente seu sítio catalítico, apresentam conformações, alterando sutilmente o centro de reatividade (o seu sítio catalítico) para que se torne receptível ao substrato, bem como também hábil posteriormente para “soltar” o produto durante todo o evento reacional.⁵

A teoria do encaixe induzido, criada por Koshland e colaboradores (1958), afirmou que a presença do substrato provoca mudanças na conformação da subunidade de uma enzima (sítio catalítico), permitindo uma conformação adequada para que a reação catalítica ocorra (**Figura 2B**). Portanto, a indução conformacional do substrato com o sítio catalítico permite o seu reconhecimento perfeito, ou seja, o seu encaixe conferindo a alta seletividade das reações enzimáticas. Além disso, a modificação gerada na enzima pode ser passada para enzimas próximas, o que garante a eficiência do processo.⁵

A ligação do substrato com o sítio ativo da enzima ocorre devido às interações de natureza não covalentes e de fraca intensidade, o que permite a saída do produto formado sem comprometer a estrutura enzimática. Essas interações são estabelecidas entre o substrato e as cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo da enzima, podendo ser do tipo eletrostáticas, íon-dipolo, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, transferência de carga, interações hidrofóbicas, dispersão de London. É importante ressaltar que durante e após o término da reação, a enzima não sofre alterações em sua estrutura, o que permite ser (re)utilizada por inúmeras novas catálises.⁶

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo para uma reação enzimática. **(A)** Modelo chave-fechadura. **(B)** Modelo do encaixe-induzido.



Fonte:

(A) <https://bioinfo.com.br/docagem-molecular-em-busca-do-encaixe-perfeito-e-acessivel/>

(B) <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/enzimas.htm>

Durante boa parte do século XX (1920-1980), biólogos e químicos passaram a trabalhar de forma independente em suas teorias. A Biologia se dedicando aos estudos da morfologia, o comportamento dos seres vivos e o aprofundamento sobre as enzimas (reações, caracterização, cofatores, estabilidade, etc.). Enquanto a Química dedicou-se grandes avanços nos estudos das reações entre as moléculas e suas propriedades, especialmente na área de Química Orgânica. Porém, nas duas últimas décadas (1980-2000), com o avanço da chamada Biologia Molecular e da Síntese Orgânica, muitos pesquisadores de ambas as áreas notaram a capacidade e a necessidade da complementação e da reunião da Química com a Biologia e vice-versa.⁶

As enzimas são moléculas poliméricas proteicas resultantes da combinação de aminoácidos naturais quirais. Devido as enzimas serem macromoléculas enantiomericamente puras que catalisam as reações (bio)químicas passaram a ser utilizadas com frequência, por químicos orgânicos, como reagentes catalíticos na síntese orgânica para promoverem reações estereosseletivas. Contudo, devido muitas enzimas requerem cofatores e serem instáveis quando isoladas das células, os químicos orgânicos passaram a promover as reações químicas também

empregando os próprios agentes biológicos, dando origem à subárea da Química Orgânica, nomeada de Biocatálise.⁷

1.2. Em busca de reações sustentáveis

Com o avanço da Ciência e da (Bio)Tecnologia, tornou-se consenso entre os cientistas que as pesquisas ao nível mais fundamental da matéria (nível molecular) será cada vez mais recorrente a busca por planejamento frente ao uso de matérias-primas de fontes renováveis, processos menos poluentes e de menor custo energético, bem como a geração de produtos mais sustentáveis, bem como compostos e materiais que sejam biodegradáveis.³⁻⁴

Contudo, existem também obstáculos e resistências em alguns setores da sociedade, especialmente as indústrias e os governos que agem, por vezes, na contramão da sustentabilidade. Por exemplo, a exploração de matérias-primas finitas do meio ambiente, o baixo rendimento em cadeias de fabricação de produtos, o que contribui para a geração de uma grande quantidade de resíduos. A produção de componentes tóxicos ao meio ambiente (plásticos, pesticidas, explosivos), a queima excessiva de combustíveis fósseis derivados de petróleo, de carvão mineral, de xisto, etc.³⁻⁴

Mais especificamente na área da Química se faz necessário melhorias dos processos, bem como o desenvolvimento de novas reações químicas mais sustentáveis. Neste contexto as reações promovidas por agentes biológicos vêm ganhando destaque devido a seletividade e a eficiência frente a muitos processos tradicionais. Atualmente, muitos métodos produtivos que operam por biotransformações foram catalogados recentemente nas mais diversas aplicações.³⁻⁴

Todavia, ainda existe uma certa dificuldade no meio científico e principalmente industrial em implementar processos biocatalíticos para as transformações químicas, devido também às dificuldades dos químicos em implementarem os sistemas biológicos em suas transformações.

Na área farmacêutica é de interesse que muitos compostos sejam obtidos na forma enantiomericamente pura. Em muitos compostos, dependendo da configuração dos grupos substituintes em torno do centro quiral da molécula de um dos enantiômeros, este poderá ter um efeito biológico completamente distinto do

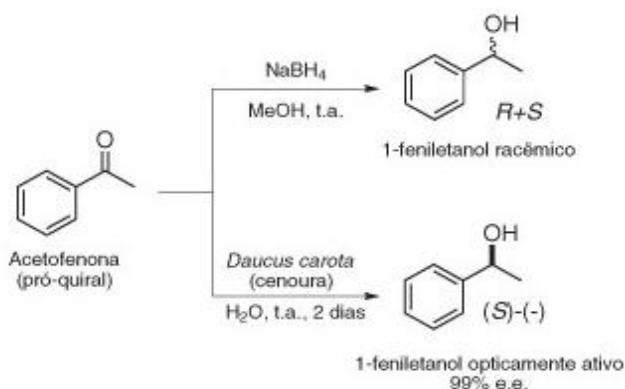
esperado devido à sua incompatibilidade com o receptor do organismo alvo que comumente são as próprias enzimas.³⁻⁴

Um exemplo de quiralidade muito importante é criação de alcoóis quirais em moléculas, por exemplo a partir da redução de cetonas assimétricas. Reagentes aquirais, como os hidretos (NaBH_4 , LiAlH_4) comumente utilizados nestas transformações, após promoverem as reações de redução eficientemente em termos de praticidade e rendimento, fornecem produtos quirais, porém racêmicos (**Figura 3**).⁸

Por outro lado, a pureza enantiomérica de hidretos quirais de boro e as enzimas garantem a alta ou total estereosseletividade das reações catalisadas por esses compostos, favorecendo em muitos casos a formação majoritária ou total de apenas um dos enantiômeros durante a redução de uma cetona pró-quiral. Inclusive as enzimas podem ser mais vantajosas que os hidretos quirais, devido ao fato de serem biodegradáveis e de fontes renováveis. Destaca-se que a fonte de hidreto no sistema biológico frente às reduções de grupos carbonílicos (cetonas e aldeídos) são provenientes de moléculas orgânicas denominadas de cofatores, tais como as coenzimas NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida).³⁻⁴

Um exemplo de reação sustentável é a redução da acetofenona com a cenoura (Figura 3). A cenoura (*Daucus carota*) tem sido usada com sucesso nas reduções de cetonas pró-quirais, apresentando como resultados, em alguns casos, uma conversão de 97% e um excesso enantiomérico (e.e.) superior a 99%, sendo um dos biocatalisadores conhecidos mais eficientes. As enzimas que catalisam estas reações de redução de cetonas são chamadas de desidrogenases, pertencentes a uma subclasse das oxidorreduções, as quais são responsáveis pelas reações de oxidação-redução em sistemas biológicos (**Figura 3**).⁹

Figura 3 - Redução da acetofenona com boro-hidreto de sódio e cenoura.



Fonte: Quim. Nova, Vol. 35, No. 2, 435-437, 2012.

<https://patyqmc.paginas.ufsc.br/files/2019/07/Estereoqui%CC%81mica.pdf>

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão)

O fungo *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarioto e unicelular que pertence ao Reino dos Fungos (Fungi) (**Figura 4A**). A levedura *S. cerevisiae*, popularmente conhecida como fermento de pão e de bebidas alcoólicas, é um microrganismo que tem destaque na produção atual de alimentos, fármacos, proteínas recombinantes, vacinas e produtos de biomassa, como o bioetanol.⁶ Além disso, tem sido uma ótima alternativa pelos químicos sintéticos para a redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos, principalmente pela sua disponibilidade, manuseio simples e ser de baixo custo.⁶ Seu potencial redutor foi observado primeiramente por Dumas (1874) que ao adicionar enxofre à uma suspensão dessa levedura em presença de solução de açúcar, notou o desprendimento de gás sulfeto de hidrogênio (H_2S).⁶

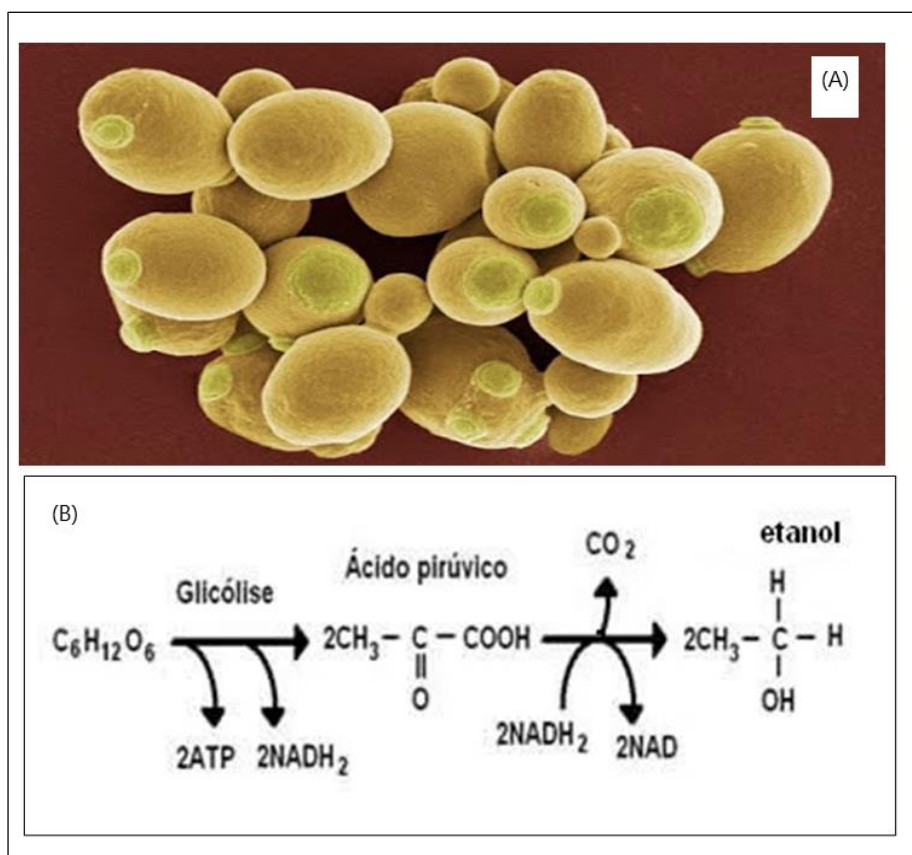
A partir dessa descoberta, a *S. cerevisiae* passou a ser utilizada amplamente para promover reações fermentativas, especialmente para a produção de etanol no Brasil. A fermentação é o processo de metabolização incompleta de açúcares, com a liberação de energia, ocorrendo em baixa ou mesmo na ausência de oxigênio (**Figura 4B**).⁶ E com o advento do genoma da *S. cerevisiae*, fisiologia e metabolismo, uma grande gama de compostos orgânicos pode ser convertida em produtos de alta pureza enantiomérica.

As células da *S. cerevisiae* produzem enzimas que podem ser utilizadas nas reações de biocatálise de redução de cetonas. Várias vantagens sobre o uso dos

catalisadores quirais biológicos, por exemplo, a simplicidade de execução da reação, a não-toxicidade do agente redutor, baixo custo, condições brandas de reação, fácil obtenção do biocatalisador, reação em meio aquoso, etc. As principais desvantagens são a alta quantidade de biomassa e as etapas de extração que podem ser exaustivas.⁶

As desidrogenases possuem grande poder redutor sobre ligações duplas carbono-oxigênio, principalmente carbonilas pró-quirais de aldeídos e cetonas. A redução de grupos carbonílicos por essas enzimas leva à formação de alcoóis opticamente puros ou enriquecidos, os quais podem servir de insumos para as indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosmética, agricultura, etc. Por essa razão, as redutases se tornaram reagentes largamente utilizadas na síntese orgânica, especialmente na presença de organismos vivos (microrganismos, ex. leveduras).⁶

Figura 4 - (A) Levedura unicelular. **(B)** Reação geral de oxidação da glicose em etanol por *S. cerevisiae*.

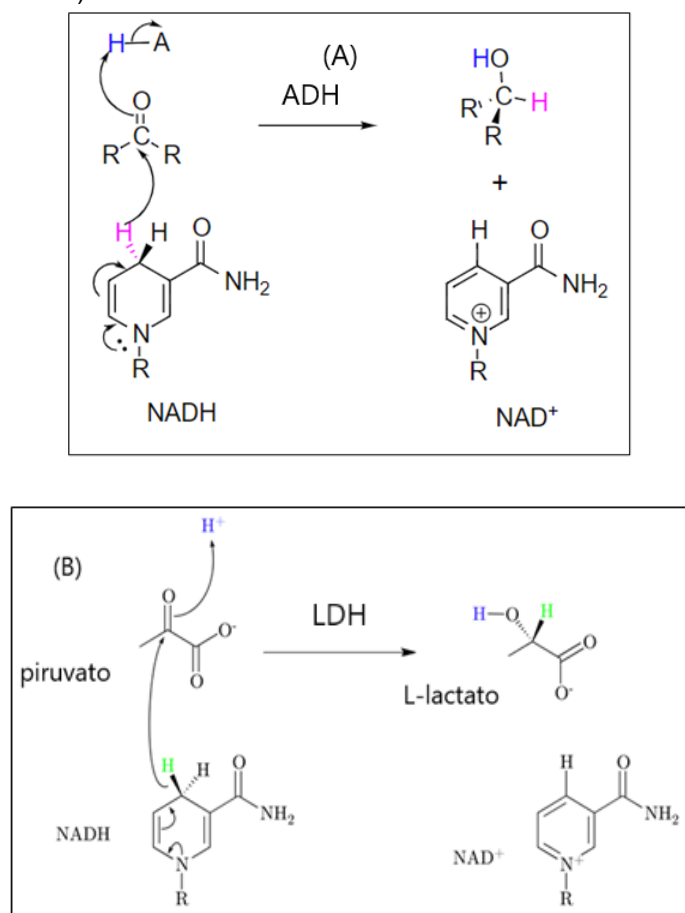


Fonte: (A) <https://www.saintvinsaint.com.br/2015/06/informacoes-uteis-sobre-leveduras-ou/>
 (B) <https://www.preparaenem.com/biologia/fermentacao.htm>

A redução de carbonilas pró-quirais em alcoóis enantiomericamente puros ocorre pela transferência de um átomo de hidrogênio (hidreto) contido nas coenzimas NADH ou NADPH por meio das redutases presentes nas células dos microrganismos. Nesse processo, o átomo de hidrogênio é retirado das moléculas de NADH ou NADPH e transferido para o átomo de carbono da carbonila, que passa a ser um centro assimétrico e as coenzimas assumem suas formas oxidadas NAD^+ e NADP^+ . Ao final dessa transferência de hidrogênio, obtém-se, portanto, um álcool quiral (**Figura 5A**).⁶

No processo da fermentação ácida ocorre a conversão de piruvato em lactato através da adição de hidreto usando a enzima lactato desidrogenase e produzindo NAD^+ . Este processo ocorre no músculo com baixa concentração de oxigênio e em algumas bactérias. Nestes casos, a reação que é responsável pelo sabor azedo do chucrute e do iogurte (**Figura 5B**).

Figura 5 - (A). Reação geral de um grupo carbonílico de cetona com a enzima álcool desidrogenase (ADH) e o cofator NADH. **(B).** Reação geral de redução do piruvato a L-lactato com a enzima lactato desidrogenase (um tipo de ADH).



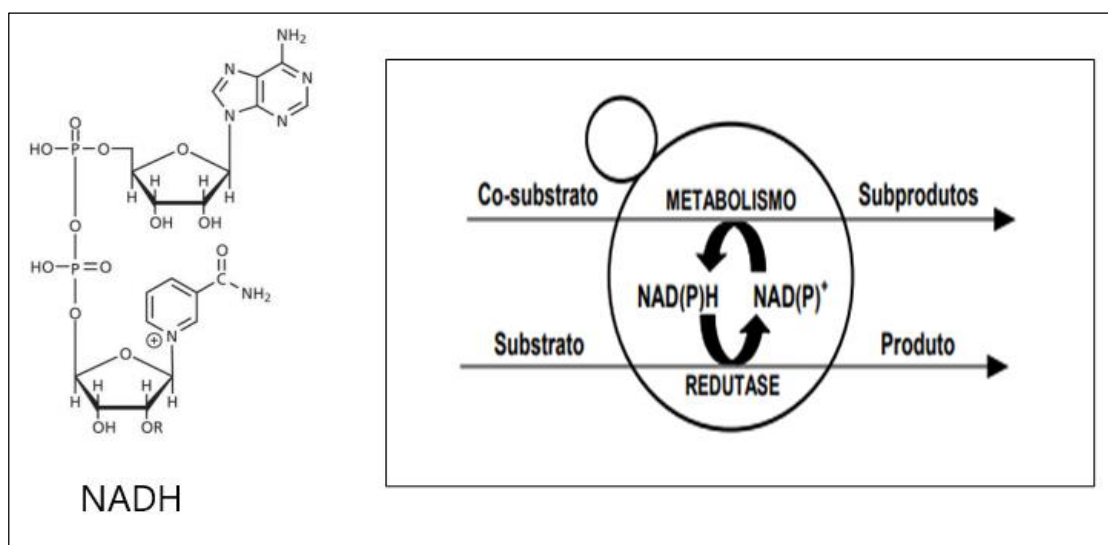
Fonte:

https://chem.libretexts.org/Courses/can/org/19%3A_Aldehydes_and_Ketones%3A_Nucleophilic_Addition_Reactions/19.13%3A_19.12_Biological_Reductions
https://en.wikipedia.org/wiki/Lactate_dehydrogenase

As coenzimas em suas formas oxidadas NAD^+ e NADPH^+ necessitam retornar às suas formas originais NADH e NADPH . Para isso, essas coenzimas passam por um processo de regeneração, onde um co-substrato atua como transferidor de hidreto ao cofator. Nesse processo, moléculas doadoras de elétrons, tais como glicose, sacarose ou etanol retornam as moléculas de NAD^+ e NADPH^+ às formas reduzidas NADH e NADPH logo após a transferência do átomo de hidrogênio ao substrato carbonílico. Esse ciclo de reciclo pode ser representado simplificadaamente na **Figura 6**.⁶

Desta forma, esta monografia visou realizar um estudo biocatalítico de redução de cetonas com *S. cerevisiae*.

Figura 6 - Representação geral do ciclo de redução de compostos carbonílicos e reciclo das coenzimas envolvendo as células da levedura *S. cerevisiae*.



Fonte:

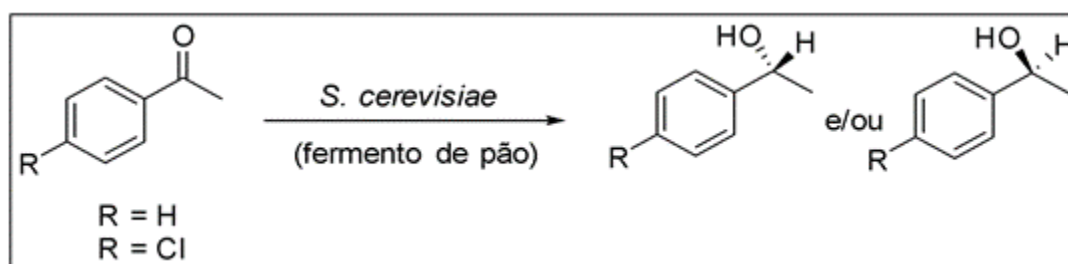
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/90616/240343.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi realizar a redução biocatalítica da acetofenona e da *p*-cloroacetofenona com fermento de pão comercial (fermento biológico *in natura* – *Saccharomyces cerevisiae*).

A proposta deste estudo foi elaborar uma aula prática para a disciplina de Laboratório de Química Orgânica, ministrada no 5º Período do Curso de Bacharelado em Química do IQSC. O **Esquema 1**, ilustra a proposta deste estudo.

Esquema 1 – Redução da acetofenona e *p*-cloroacetofenona com fermento de pão.



Fonte: Autoria própria.

Metas

1. Realizar a reação de redução da acetofenona e da *p*-cloroacetofenona com boro-hidreto de sódio para a obtenção dos alcoóis racêmicos correspondentes.
2. Realizar a reação de redução da acetofenona e da *p*-cloroacetofenona na presença de células vivas *S. cerevisiae* utilizando 100 e 200 µL de substrato com o objetivo de avaliar a enantiosseletividade na formação dos alcoóis obtidos.
3. Realizar as análises por cromatografia a gás (CG-FID) em coluna quiral para promover a separação dos enantiômeros e consequentemente determinar os excessos enantioméricos dos alcoóis obtidos na redução com fermento de pão.
4. Caracterizar todos os reagentes (cetonas) e produtos (alcoóis) por Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C), Infravermelho (IV).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Foram utilizados neste trabalho os reagentes acetofenona ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-COCH}_3$, 99%) e *p*-cloro-acetofenona (*p*-Cl- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-COCH}_3$, 99%) adquiridos da Sigma-Aldrich, SP, Brasil. O boro-hidreto de sódio (NaBH_4 , 98%) foi adquirido da Vetec, SP, Brasil.

Os solventes grau P.A., o hexano ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, 99%) e o acetato de etila ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, 99%) foram adquiridos da Merck Sigma-Aldrich, SP, Brasil.

O metanol (CH_3OH , P.A., 9%), o diclorometano (CH_2Cl_2 , P.A., 99%), o sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4 , 99%) e o sulfato de magnésio anidro (MgSO_4 , 99%) foram adquiridos da Synth, SP, Brasil.

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 92,8° GL) foi adquirido de fonte comercial (Marca Tupi). Placa de cromatografia em camada delgada (TLC Silica gel 60 F254 de alumínio) foi adquirido da Merck Sigma-Aldrich, SP, Brasil.

O fermento biológico *in natura* (fermento de pão) Biox foi adquirido em um centro comercial de São Carlos no Bairro Arnon de Melo (**Figura 7**).

Figura 7 - Fermento Biológico Biox utilizado nas reações de biocatálise.

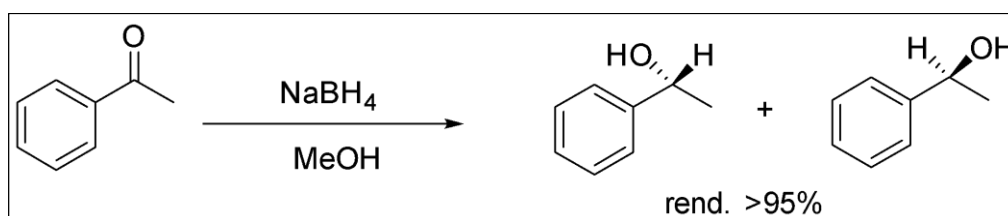


Fonte: Autoria própria.

3.2 Redução da acetofenona com o boro-hidreto de sódio

O **Esquema 2** mostra a reação de redução da acetofenona com boro-hidreto de sódio.

Esquema 2 - Redução da acetofenona com boro-hidreto de sódio em metanol.



Fonte: Autoria própria.

Em um balão de fundo redondo de 125 mL pesou-se cerca de 0,5 g (4,16 mmols) de acetofenona e acrescentou 10 mL de metanol sob constante agitação em placa magnética à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se aos poucos e parcialmente boro-hidreto de sódio ao meio reacional, até ter sido observada a completa conversão da acetofenona ao correspondente álcool (1-fenil-etanol).

Para o acompanhamento da reação foram realizados ensaios por cromatografia em camada delgada (CCD), seguida de revelação em câmara de UV (JV-365 & Germicida-254, Tecnal) a 254 nm referentes às manchas de absorção da acetofenona e do álcool formado durante a reação de redução. A placa de CCD teve como eluentes uma mistura de 0,5 mL de acetato de etila para 4,5 mL de hexano. Para a eluição utilizou-se uma cuba cromatográfica de vidro. A redução da acetofenona foi dada como bem sucedida no momento em que não se observou mais a presença da acetofenona no meio reacional. Neste ponto, cessou-se a adição do reagente redutor, o boro-hidreto de sódio.

Após o término da reação, colocou-se o balão reacional em um rotoevaporador para a evaporação total do metanol, restando o produto de redução. Retirou-se o balão do rotoevaporador e adicionou-se 20 mL de acetato de etila. Esta solução foi transferida para um funil de separação de 125 mL, o qual estava fixado em um suporte universal, contendo a mesma quantidade de água (20 mL), para prosseguir com a extração por partição líquido-líquido. Logo após as transferências, agitou-se o funil de

separação e colocou sobre o suporte universal, observando a formação de duas fases imiscíveis, a fase aquosa (inferior) e a fase orgânica (superior).

Coletou-se ambas as fases em frascos erlenmeyer de 125 mL separadamente, descartando posteriormente a fase aquosa. A fase orgânica correspondente foi transferida para um outro balão de fundo redondo através de um funil de filtração simples contendo um pequeno chumaço de algodão. Ao filtrado foi adicionada uma pequena quantidade de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) com o intuito de retirar resquícios de água na solução filtrada. Por fim, levou-se o balão contendo o filtrado ao rotoevaporador (Marca Fisaton) para a remoção do excedente de solvente.

Por fim, o produto de redução obtido (1-fenil-etanol) foi transferido para um pequeno frasco de vidro rotulado, juntamente com uma pequena quantidade de acetato de etila usado para a transferência de toda a fração do álcool obtido. Deixou-se o frasco na bancada para evaporar o solvente, pesou-se e determinou-se o rendimento. Não houve a necessidade de realizar a etapa de purificação por cromatografia em coluna com sílica gel.

O 1-fenil-etanol obtido foi caracterizado por Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C), Infravermelho (IV), bem como submetido à separação por cromatografia a Gás (CG-FID) equipado com coluna capilar quiral de β -ciclodextrina (CP-Chirasil-Dex, CB 0,25 m x 0,25 μm , Agilent, J & Scientific) para a separação dos enantiômeros.

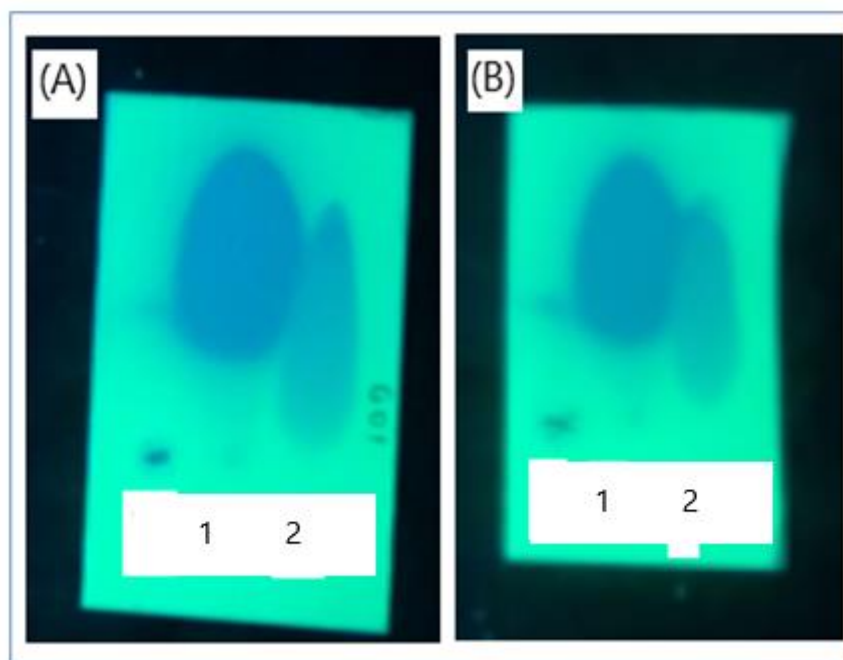
3.3 Reações de redução da acetofenona (100 μL e 200 μL) com o fermento biológico comercial Biox (fermento de pão)

Primeiramente pesou-se cerca de 25 g de fermento de pão Biox *in natura* (*Saccharomyces cerevisiae*) em dois frascos erlenmeyer e em seguida adicionou-se 100 mL de água destilada em ambos os frascos. Depois, em um dos frascos erlenmeyer adicionou-se 100 μL (0,85 mmol) de acetofenona e no outro frasco erlenmeyer adicionou-se 200 μL de acetofenona (1,71 mmol). Em cada um dos frascos erlenmeyer também se adicionou 1 mL de etanol. Colocou-se ambos os frascos erlenmeyer em agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente.

Observação: Os volumes de 100 μL e 200 μL de acetofenona foram utilizados porque contém quantidades facilmente manipuláveis do reagente para uma aula de ensino de laboratório.

No dia seguinte, realizou-se uma placa de cromatografia em camada delgada de cada uma das reações e procedeu-se o teste de revelação física das manchas em UV (254 nm). Foram usadas duas plaquinhas de CCD, uma para a reação com 100 μ L de acetofenona e a outra para a reação de 200 μ L de acetofenona. As amostras das reações foram aplicadas com tubos capilares e ao lado dos spots também se aplicou gotículas do álcool racêmico (**Figuras 8A-B**).

Figura 8 - Placas de CCD das reações de redução da acetofenona com fermento de pão Biox reveladas em UV (254 nm). (A) 100 μ L e (B) 200 μ L.



Fonte: Autoria própria.
Placas (A-B): 1 Acetofenona. 2. 1-Fenil-etanol.

3.3.1 Extração das reações de redução da acetofenona (100 µL e 200 µL) com fermento de pão Biox

Após a obtenção do bom resultado nas reduções biocatalíticas com o fermento de pão Biox para as duas reações com a acetofenona, prosseguiu-se com a extração de acordo com procedimento descrito a seguir.

Transferiu-se, separadamente, as soluções das reações reduzidas em 100 mL de meio reacional (100 µL e 200 µL de acetofenona) para dois frascos de 250 mL específicos para centrifugação. Ajustou-se os pesos dos frascos completando-se o volume com água de modo que ficassem com os mesmos pesos, para poderem ser encaminhados para a operação de centrifugação.

Decorrido o tempo da centrifugação (5 minutos, 10.000 rpm, 20° C), retirou-se os frascos cuidadosamente do rotor giratório da centrífuga, evitando agitação manual e transferiu-se, separadamente, os conteúdos líquidos (sobrenadantes: 100 mL) dos frascos de 100 µL e 200 µL para um funil de separação de 250 mL.

Em seguida adicionou-se 30 mL de acetato de etila ao sobrenadante. Agitou-se o funil de separação e colocou no suporte universal para a separação das fases. Ao observar nitidamente a interface entre as fases orgânica (superior) e aquosa (inferior), coletou-se a fase aquosa em um frasco erlenmeyer e a fase orgânica em outro erlenmeyer. Posteriormente, retornou-se a fase aquosa extraída ao funil de separação e adicionou-se uma nova porção de 30 mL de acetato de etila para realizar uma segunda extração. Agitou-se o funil novamente e colocou em repouso no suporte universal para a separação entre as duas fases.

Separou-se a fase aquosa e a fase orgânica e transferiram-as para os mesmos frascos erlenmeyer usados na primeira extração. Em seguida adicionou-se com uma espátula uma porção de sal de sulfato de sódio anidro ao frasco erlenmeyer contendo a fase orgânica para a remoção de pequenas quantidades de água da solução. A fase aquosa posteriormente foi descartada.

Filtrou-se a solução orgânica extraída contendo o agente secante para um balão de fundo redondo, previamente pesado, através de um funil de vidro contendo um pequeno chumaço de algodão como material filtrante. Levou-se o balão com o filtrado para o retoevaporador com a finalidade de remover todo o acetato de etila, restando somente o produto reduzido da acetofenona dentro do balão. Observou-se

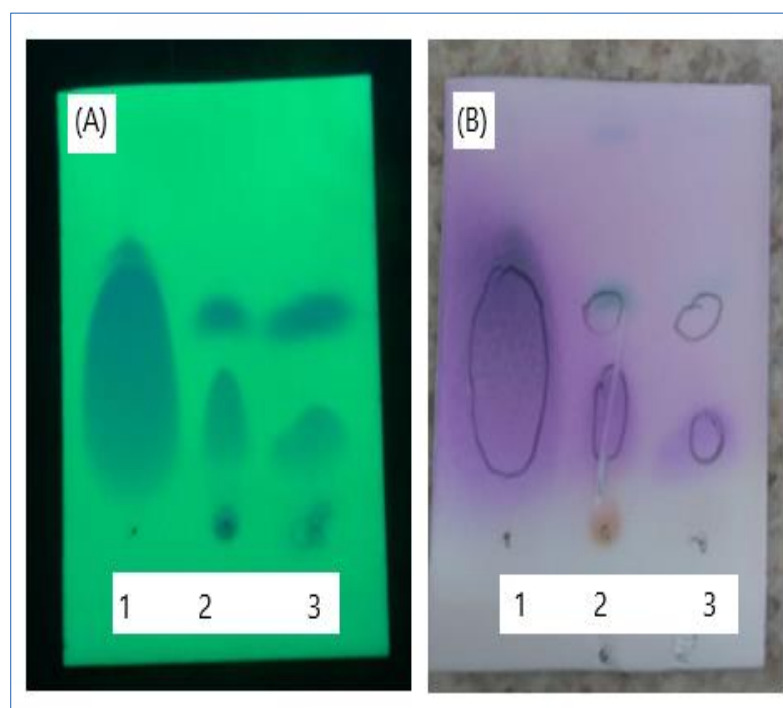
que um sólido foi obtido e pesou-se para determinar o rendimento das reações com 100 μ L e 200 μ L de acetofenona.

Por fim, com o auxílio de solvente diclorometano, transferiu-se o produto reduzido dos balões para frasquinhos pequenos devidamente pesados e etiquetados.

Concluída as extrações das reações de redução da acetofenona, diluiu-se as amostras das soluções reacionais de 100 μ L, 200 μ L e a mistura racêmica dos álcoois, efetuou-se a eluição por CCD utilizando hexano e acetato de etila (4,5:5). Em seguida realizou-se a revelação das placas na presença de luz UV a 254 nm (**Figura 9A**).

Finalmente, com o auxílio de uma pinça mergulhou a pequena placa de CCD previamente revelada em luz UV em uma solução química reveladora ácida de *p*-anisaldeído (2,68 mL de *p*-anisaldeído, 50 mL de etanol e 500 μ L de ácido sulfúrico) submetendo-a em seguida a um jato de ar quente logo (**Figura 9B**).

Figura 9 - Placas de CCD das reações de redução da acetofenona (100 μ L e 200 μ L) com fermento de pão Biox após as extrações. **(A)** Reações reveladas na presença de luz UV a 254 nm. **(B)** Reações reveladas em solução ácida de *p*-anisaldeído.



Fonte: Autoria própria.

1. Fenil-etanol racêmico. 2. Reação com 100 μ L de acetofenona.
3. Reação com 200 μ L de acetofenona.

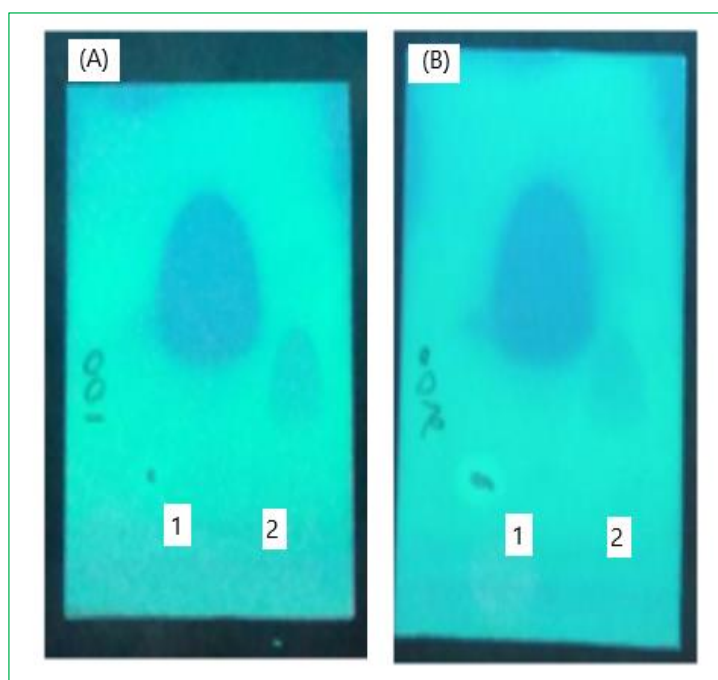
3.3.2. Segunda repetição da reação de redução da acetofenona (100 μ L e 200 μ L) com fermento de pão Biox

Para confirmar os estudos realizados, bem como a obtenção de mais amostras de metilfenilcarbinol obtidos pela redução de 100 μ L e 200 μ L de acetofenona com fermento de pão Biox, realizou-se um segundo conjunto de reações utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Esta repetição também teve como objetivo a confirmação da reação de redução com o uso de fermento de pão Biox. A **Figura 10** ilustra as placas de CCD destas reações (100 e 200 L) reveladas em luz UV a 254 nm, antes da extração, confirmando que ocorreu a formação do produto de redução.

Nota: A primeira vez em que se realizou os estudos da reação de redução da acetofenona, utilizou-se um fermento de pão comercial, porém liofilizado. Neste caso, não se obteve a formação do álcool (1-fenil-etanol), mesmo fazendo a reação por duas vezes e em dias diferentes. Dados não apresentados na monografia.

Figura 10 - Placas de CCD das reações (segunda repetição) de redução da acetofenona (100 μ L e 200 μ L) com fermento de pão Biox antes das extrações reveladas na presença de luz UV a 254 nm. (A) 100 μ L e (B) 200 μ L.

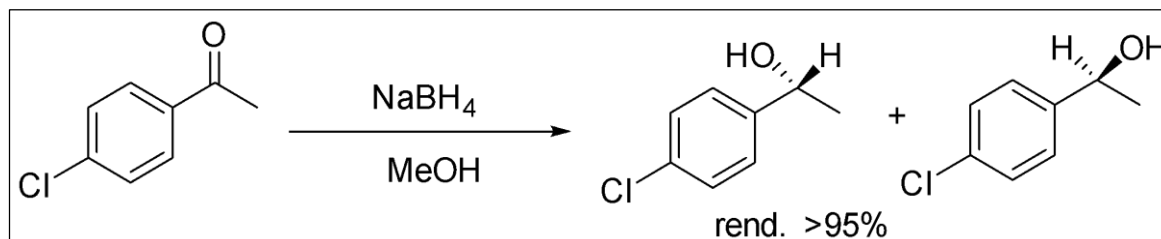


Fonte: Autoria própria.
Placas (A-B) 1. Acetofenona. 2. 1-Fenil-etanol

3.4 Redução da *p*-cloro-acetofenona com o boro-hidreto de sódio

O **Esquema 3** mostra a reação de redução da *p*-cloro-acetofenona com boro-hidreto de sódio.

Esquema 3 - Redução da *p*-cloro-acetofenona com boro-hidreto de sódio em metanol.



Fonte: Autoria própria.

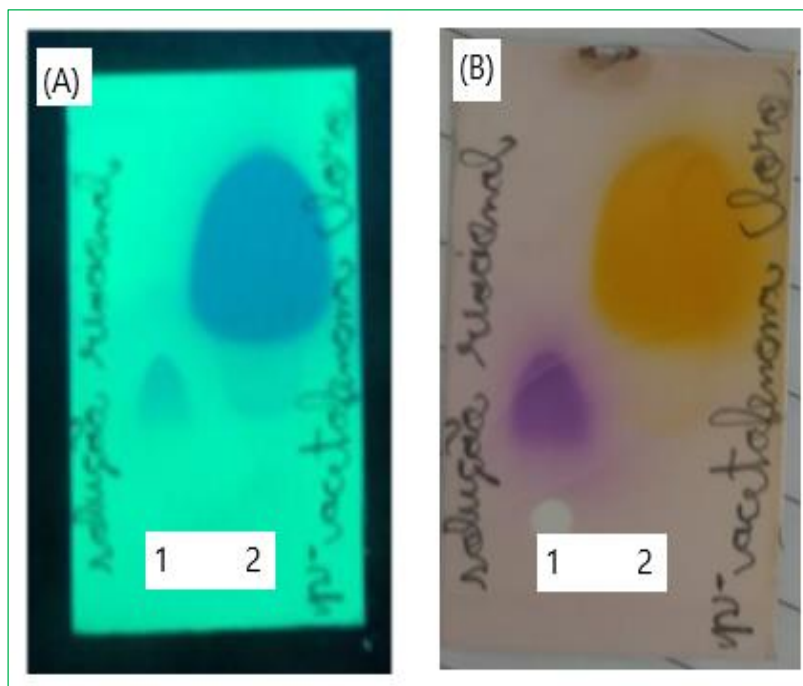
Em um balão de 125 mL pesou-se 0,5077 g (3,28 mmol) da *p*-cloro-acetofenona e logo em seguida, acrescentou-se 10 mL de metanol e uma pequena quantidade de boro-hidreto de sódio sob constante agitação magnética à temperatura ambiente.

Realizou-se uma cromatografia em camada delgada eluindo a placa de CCD com uma solução contendo 0,5 mL de acetato de etila para 4,5 mL de hexano em uma cuba cromatográfica de vidro. Em seguida revelou-se fisicamente a placa sob luz UV a 254 nm (**Figura 11**).

Todas as etapas para a redução e extração por partição líquido-líquido da *p*-cloro-acetofenona seguiu-se os mesmos procedimentos empregados na redução da acetofenona com o boro-hidreto de sódio (**Seção 3.1**).

O *p*-cloro-1-fenil-etanol obtido foi caracterizado por Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C), Infravermelho (IV), bem como submetido à separação por Cromatografia a Gás (CG-FID) equipado com coluna capilar quiral de β -ciclodextrina (CP-Chirasil-Dex, CB 0,25 m x 0,25 μm , Agilent, J & Scientific).

Figura 11 - Placas de CCD da reação de redução da *p*-cloro-acetofenona com NaBH₄. **(A)** Reação revelada na presença de luz UV a 254 nm. **(B)** Reação revelada em solução ácida de *p*-anisaldeído.



Fonte: Autoria própria.

Placas **(A-B)**: 1. *p*-Cloro-1-fenil-etanol racêmico. 2. *p*-Cloro-acetofenona.

3.5 Reações de redução da *p*-cloro-acetofenona (100 µL e 200 µL) com o fermento biológico comercial Biox (fermento de pão)

Pesou-se cerca de 25 g de fermento de pão Biox (*Saccharomyces cerevisiae*) em dois frascos erlenmeyer e em seguida adicionou-se 100 mL de água destilada em ambos os frascos. Depois, em um dos frascos erlenmeyer adicionou-se 100 µL (0,85 mmol) de *p*-cloro-acetofenona e no outro frasco erlenmeyer adicionou-se 200 µL de *p*-cloro-acetofenona (1,71 mmol). Em cada um dos frascos erlenmeyer também se adicionou 1 mL de etanol. Colocou-se ambos os frascos erlenmeyer em agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente.

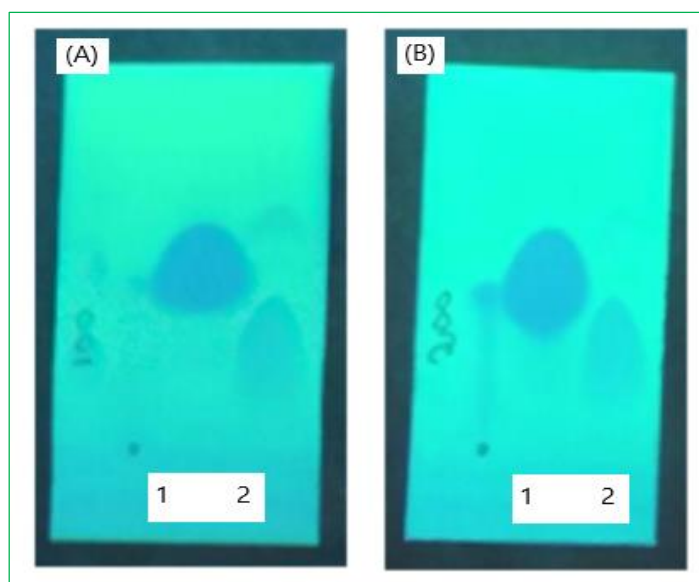
Observação: Os volumes de 100 e 200 µL da *p*-cloro-acetofenona foram escolhidos para serem utilizados pela mesma razão descrita para a acetofenona: são quantidades facilmente manipuláveis do reagente para alunos em uma aula prática de ensino de laboratório.

No dia seguinte, realizou-se uma placa de cromatografia em camada delgada de cada uma das reações e procedeu-se o teste de revelação física das manchas na

presença de luz UV (254 nm). Foram usadas duas plaquinhas de CCD, uma para a reação com 100 µL de *p*-cloro-acetofenona e a outra para a reação de 200 µL de *p*-cloro-acetofenona. As amostras das reações foram aplicadas com tubos capilares nas placas de CCD e ao lado dos spots também se aplicou o álcool racêmico (*p*-cloro-1-fenil-etanol) (**Figura 12A-B**).

Realizado o teste em plaquinhas de CCD procedeu-se as extrações das reações como descrito na **Seção 3.3.1**.

Figura 12 - Placas de CCD das reações de redução da *p*-cloro-acetofenona (100 µL e 200 µL) com fermento de pão Biox antes das extrações. **(A)** Reação com 100 µL reveladas na presença de luz UV a 254 nm. **(B)** Reação com 100 µL reveladas na presença de luz UV a 254 nm.



Fonte: Autoria própria.
Placas **(A-B)**: 1. *p*-Cloro-acetofenona. 2. *p*-Cloro-1-fenil-etanol.

3.6 Análises por CG-FID, CG-EM, RMN e IV

CG-FID: Cromatografia a Gás acoplada à Detecção por Ionização de Chama (CG-FID): cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC 2010 equipado com auto-injetor Shimadzu AOC 20i, um detector de ionização de chama (FID – Flame Ionization Detector) e uma coluna quiral CP-Chiralsil-DEX (β -ciclodextrina) (Agilent Technology (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm)).

CG-EM: Para as análises foi utilizado um Cromatógrafo a Gás Shimadzu/GC2010 equipado com auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010 plus) com impacto de elétrons (IE, 70 eV). O forno do cromatógrafo a gás foi

equipado com uma coluna de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As condições cromatográficas utilizadas foram: gás carreador He, temperatura de injeção de 250°C, razão de Split 5.0. Coluna DB-5 nas de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, rampa de temperatura: 120°C por 1 minuto, taxa de aquecimento 20°C/min por 15 minutos, pressão de 73,8 kPa, fluxo de 6,6 mL/min, velocidade linear de 36,1 cm/seg., tempo de análise de 25 minutos.

RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com Transformada de Fourier: os espectros foram obtidos no espectrômetro da marca Agilent Technologies: modelo 500/54 premium shielded com as frequências de 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). A faixa de deslocamentos químicos dos sinais de ^1H foi de 0 a 14 ppm e a faixa de deslocamentos químicos dos sinais de ^{13}C foi de 0 a 230 ppm. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hz. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3). As multiplicidades dos sinais foram relatadas em singlete (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), quarteto (q) e multiplete (m). Os sinais de referência para os núcleos de ^1H e ^{13}C nos espectros obtidos foram relativos ao padrão interno de tetrametilsilano (TMS) ou do solvente deuterado.

IV: Espectroscopia de Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier: as análises foram feitas dissolvendo as amostras das cetonas e dos alcoóis em diclorometano. Estas soluções foram gotejadas sobre uma cela de um espectrômetro portátil da marca Bruker modelo Alpha ECO-ATR (ZnSe). Após evaporação do solvente os espectros foram obtidos na faixa de 450 a 4000 cm^{-1} . As análises de IV foram feitas no Laboratório de Síntese Orgânica “Prof. Warner Bruce Kover” coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Bender Burtoloso do IQSC-USP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados da reação de redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com boro-hidreto de sódio para a obtenção dos alcoóis racêmicos correspondentes

As reações de redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com boro-hidreto de sódio ocorreram com sucesso. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e após a finalização das reações foram extraídas.

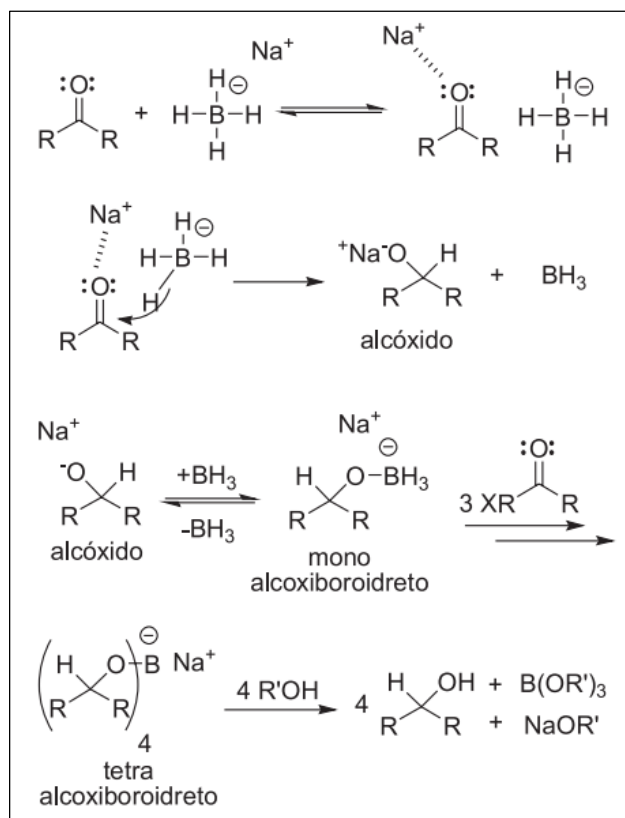
As reações forneceram rendimentos quantitativos dos produtos, o 1-fenil-etanol e o *p*-cloro-1-fenil-etanol. O mecanismo da reação de redução com boro-hidreto de sódio é mostrado na **Figura 13**.¹⁰

As reações de redução à carbonila de cetonas e aldeídos utilizando o NaBH₄, uma espécie doadora de hidreto, é uma das mais importantes reações, tanto pela disponibilidade do reagente, quanto pela praticidade em se realizar as reduções.

O NaBH₄ reduz apenas aldeídos e cetonas, por isso é menos reativo que outros agentes redutores, como o hidreto de lítio e alumínio (LiAlH₄). A sua menor reatividade se deve a menor diferença de eletronegatividade (χ_x) entre a ligação B-H ($\chi_x = 0,1$) que a ligação Al-H ($\chi_x = 0,5$). Enquanto os ácidos carboxílicos e seus derivados (amidas e ésteres) não são reduzidos pelo boro-hidreto de sódio.¹⁰

O mecanismo envolvido na reação de redução com boro-hidreto de sódio, ainda é debatido na literatura, pois há discussões se o sódio atua ou não como um tipo de ácido de Lewis ativando a carbonila, ou seja, deixando mais eletrofílica facilitando ainda mais a adição do hidreto. Independente dessas discussões, de forma geral, o mecanismo é bem compreendido conforme mostrado na **Figura 13**.

Figura 13 - Mecanismo geral da redução de carbonilas (aldeídos e cetonas) com NaBH₄ com a participação do íon sódio.



Fonte: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000042>.

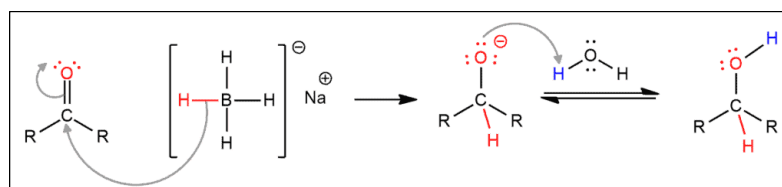
A reação de redução, em química orgânica, significa a adição de hidrogênio à molécula ou a remoção de átomos eletronegativos, como halogênio ou oxigênio da molécula.

O hidreto não é um bom nucleófilo porque não é polarizável, porém o NaBH₄ atua como um agente de transferência do ânion hidreto nucleofílico devido a diferença de eletronegatividade entre o boro e o hidrogênio. E na etapa final do processo da reação o solvente atua como uma fonte doadora de um próton. Nestes casos, os solventes próticos mais utilizados são o etanol, o metanol ou a água.⁸

Nestas condições reacionais, na primeira etapa da reação o reagente doa um hidreto ao carbono da carbonila. O oxigênio com carga negativa pode se ligar ao íon Na⁺, ao BH₃ ou mesmo ser protonado pelo solvente (**Figuras 13-14**). O primeiro intermediário obtido (monoalcoiboro-hidreto) pela primeira transferência do hidreto à carbonila pode atacar mais três substratos carbonílicos até que todos os átomos de

hidreto do reagente original tenham sido usados. Assim, um equivalente de boro-hidreto é capaz de reduzir quatro equivalentes de uma cetona a um álcool secundário (**Figuras 13-14**). O tetra-alcoxiboroidreto é hidrolisado pelo próprio solvente prótico e se o doador de próton for a água, obtém-se como subproduto o ácido bórico (H_3BO_3).⁸

Figura 14 - Destaque para a transferência de hidreto à carbonila eletrofílica seguida da doação de um próton pelo solvente (água).



Fonte: <https://chemistryscore.com/reduction-ketones-nabh4/>.

Um outro aspecto muito importante a ser considerado nas reações de redução refere-se à trajetória de entrada do hidreto às faces do grupo carbonílico planar.¹¹⁻¹⁰

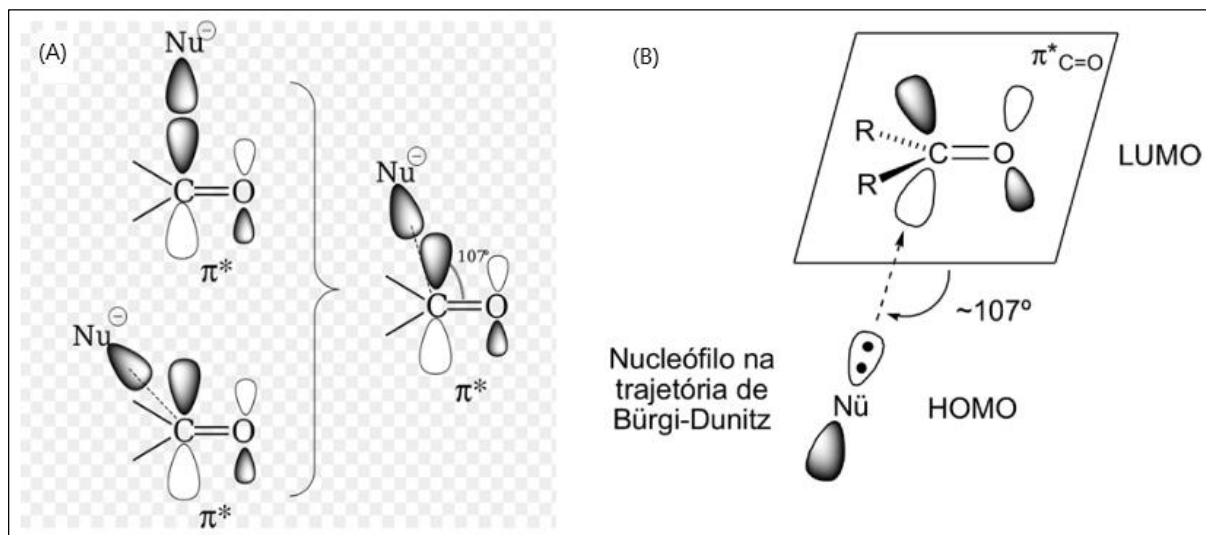
a) A aproximação do hidreto ao carbono eletrofílico da carbonila é dirigida por interações dos orbitais de fronteira de cada uma dessas espécies envolvidas. Assim, os elétrons do nucleófilo estão alocados no orbital ocupado de mais alta energia (HOMO), os quais irão interagir com o orbital desocupado de mais baixa energia (LUMO) do centro eletrofílico da carbonila (**Figura 15**).

b) O LUMO do composto carbonilado é o orbital antiligante do tipo π^* . Neste orbital, o coeficiente é maior no átomo de carbono, que representa o sítio eletrofílico. Assim, durante a aproximação do nucleófilo, o mesmo irá se direcionar ao átomo de carbono, e com esta trajetória o nucleófilo rico em elétrons evitará a repulsão eletrônica desestabilizadora com a região rica em elétrons, representada pelo orbital π ao redor do átomo de oxigênio (**Figura 15**).

c) Este ângulo de aproximação do nucleófilo durante muito tempo se imaginou sendo perpendicular (90°) ao plano dos átomos da carbonila. Contudo, é conhecido hoje que é ao redor de 107° . Essa trajetória recebeu o nome de seus descobridores (H. B. Bürgi e J. D. Dunitz). Na trajetória Bürgi-Dunitz o nucleófilo busca maximizar a superposição do HOMO do nucleófilo com o LUMO da ligação π^* (C=O) e minimizar

a repulsão com a densidade eletrônica localizada no oxigênio (no orbital p de natureza ligante) (**Figura 15**).

Figura 15 - Trajetória Bürgi-Dunitz do nucleófilo para maximizar a superposição do HOMO do nucleófilo com o LUMO da ligação π^* ($C=O$) e minimizar a repulsão com a densidade eletrônica localizada no oxigênio (no orbital π de natureza ligante).



Fonte: (A) <https://www.gratispng.com/png-o5xejr/>.

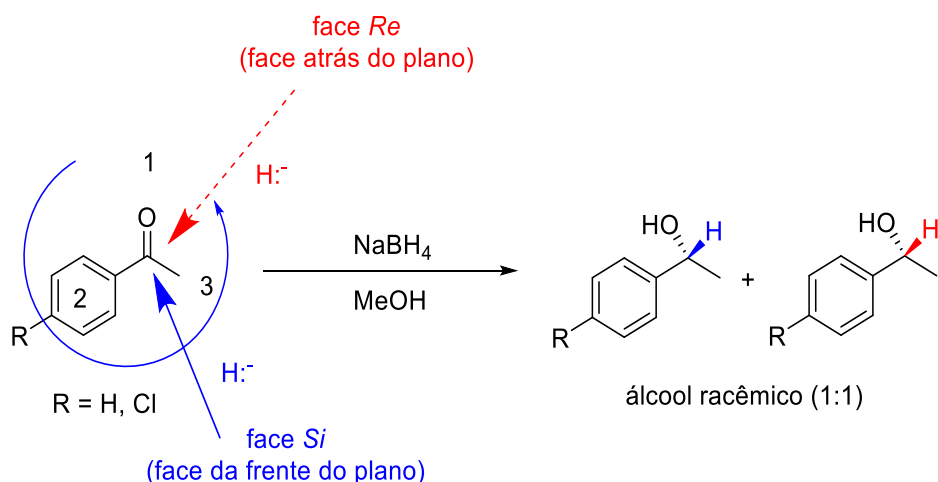
(B) <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000042>.

Através desta trajetória via reação de redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona foram obtidos os alcoóis racêmicos, o 1-fenil-etanol e o *p*-cloro-1-fenil-etanol, respectivamente. Como o agente redutor utilizado é aquiral, a adição do hidreto pela trajetória de Bürgi-Dunitz se dá com a mesma velocidade em ambas as faces do grupo carbonílico (face *Re* e face *Si*), gerando os produtos racêmicos (**Figura 16**). Vale destacar que a trajetória de Bürgi-Dunitz do hidreto sempre ocorre pelo lado do grupo menos volumoso (menor impedimento estérico).

Na **Figura 16** observa-se que a entrada do hidreto na acetofenona e na *p*-cloro-acetofenona ocorre pelo lado do grupo metila e não do anel benzênico, e por ambas as faces, ou seja, pela face *Si* (frente do plano do observador) e pela face *Re* (atrás do plano do observador).

O 1-fenil-tenol e o *p*-cloro-1-fenil-etanol foram posteriormente caracterizados por EM, RMN e IV.

Figura 16 - Adição de hidreto pelas faces *Si* e *Re* do grupo carbonílico pró-quiral (acetofenona e *p*-cloro-acetofenona). Nota: Ataque pelo lado do grupo metila.



Fonte: Autoria própria.

4.2. Redução da acetofenona e da *p*-cloroacetofenona na presença de células vivas *S. cerevisiae* (fermento de pão Biox) utilizando 100 e 200 μL

Nas imagens das placas de CCD da **Figura 8** da Seção “Parte Experimental” observou-se que a redução da acetofenona com o fermento de pão Biox após 24 h de reação teve sucesso para ambas as reações testadas (100 μL e 200 μL). Nestes casos foi possível notar um certo deslocamento das manchas nas placas de CCD referentes a acetofenona e o produto de redução, o 1-fenil-etanol para ambas as reações. No caso o álcool, por apresentar um grupo mais polar ficou mais retido que a cetona na plaquinha de CCD em todas as análises realizadas. Como a fase estacionária na plaquinha de CCD é de sílica, o álcool interagiu mais fortemente que a cetona.

A placa de CCD (**Figura 8**) foi eluída com uma mistura de acetato de etila e hexano (5:4,5) e o índice ou fator de retenção foram calculados para a acetofenona ($R_f = 0,35$) e o 1-fenil-etanol ($R_f = 0,30$).

O mesmo comportamento da reação da *p*-cloro-acetofenona também foi observado frente à redução com fermento de pão Biox. A reação foi bem sucedida após 24 h, na qual evidenciou-se a formação do produto, o *p*-cloro-1-fenil-etanol. A placa de CCD (**Figura 12**) também foi eluída com uma mistura de acetato de etila e

hexano (5,0:4,5) e o índice ou fator de retenção foram calculados para a *p*-cloro-acetofenona ($R_f = 0,71$) e para o *p*-cloro-1-fenil-etanol ($R_f = 0,50$).

Nas análises das reações de redução com fermento de pão Biox, tanto da acetofenona quanto da *p*-cloro-acetofenona, após 24 h foram realizadas as placas de CCD. Nestes casos, observou-se que os reagentes haviam sido totalmente consumidos. Desta forma procedeu-se para as etapas das extrações. Contudo, após o término das extrações, realizou-se novamente as análises por CCD e, nestes casos, verificou-se que ainda havia a presença de reagentes (cetonas). A presença das cetonas também foi confirmada posteriormente nas análises por cromatografia a gás (CG-FID).

Algumas hipóteses podem ser levantadas frente a presença das cetonas nestes casos. Durante a reação biocatalítica, em meio aquoso, a acetofenona e *p*-cloro-acetofenona, são insolúveis em água. Na execução do experimento, deve-se tomar alguns cuidados em relação à manipulação e à agitação dos frascos erlenmeyer, que neste caso foi em placa magnética. No início da montagem do sistema, pode ser que parte das cetonas ficaram retidas em contato com as paredes dos frascos erlenmeyer e não entraram totalmente em contato com a levedura. Porém, durante a extração final, todo o conteúdo do frasco é transferido e lavado algumas vezes com acetato de etila, o que poderia ter extraído estas cetonas que não reagiram, mas sem que eles estivessem em contato com o fermento de pão Biox e não terem participado efetivamente da reação de redução.

Uma outra hipótese poderia ser que devido as análises por CCD terem sido realizadas retirando-se alíquotas do meio reacional, as quais não representam todo o sistema biocatalítico, bem como durante a lise celular com o solvente acetato de etila, parte das cetonas, mesmo já contidas no interior das células ainda não passaram pelo processo de redução enzimática, mas que foram posteriormente extraídas. Essas hipóteses, se ocorreram, afetaram mais a reação com a *p*-cloro-acetofenona, pois obteve menor conversão que a acetofenona.

Como o trabalho no decorrer do período envolveu várias etapas de preparação das reações, adaptação do estudante, análises cromatográficas, não foi possível realizar mais replicadas das reações para estudar em maiores detalhes, bem como executar a purificação dos produtos por cromatografia em coluna para determinar os rendimentos. Porém, as análises por cromatografia em coluna quiral das reações biocatalíticas com a levedura foram realizadas para determinar as conversões.

E, por último elaborou-se um roteiro da reação biocatalítica com fermento de pão, a qual foi aplicada no curso de graduação na aula de laboratório de Química Orgânica ministrada no primeiro semestre de 2023 (**ANEXO**).

As análises por CG-FID em coluna quiral de β -ciclodextrina das reações de redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com o fermento de pão Biox, após as extrações, estão nas **Figuras 17 e 18**, respectivamente.

Na **Figura 17** observou-se no cromatograma que a acetofenona, que foi o reagente de partida e obtida comercialmente da Sigma-Aldrich, apresentou um tempo de retenção de 5,73 minutos. Na análise do álcool racêmico, o (\pm)-1-fenil etanol, obtido via redução com boro-hidreto de sódio, ocorreu uma boa separação dos pares de enantiômeros na coluna quiral utilizada. O enantiômero (*R*)-1-fenil-etanol apresentou um tempo de retenção de 8,57 minutos e seu par enantiomérico, o (*S*)-1-fenil-etanol um tempo de retenção de 8,84 minutos de acordo com as análises por CG-FID.

Na reação de redução biocatalítica com fermento de pão da acetofenona com 100 μ L (0,85 mmol) obteve-se uma conversão de 97% da cetona nos enantiômeros *R* e *S* do 1-fenil-etanol de acordo com as análises por CG-FID em coluna quiral. Observou-se que ocorreu um enriquecimento enantiomérico formando preferencialmente o enantiômero (*R*)-1-fenil-etanol ($t_R = 8,57$ min.).

O excesso enantiomérico é definido como a diferença absoluta entre a fração molar de cada enantiômero. Na prática, para determinar o excesso enantiomérico, deve-se obter primeiramente uma boa separação dos pares de enantiômeros, por exemplo, realizando análises por CG-FID utilizando uma coluna quiral.

Assim, através da separação dos pares de enantiômeros pode-se calcular o excesso enantiomérico, obtendo-se os valores das áreas de cada um dos picos dos correspondentes enantiômeros (*A* e *B*) conforme a **Equação 1**.

$$e.e. (\%) = (A-B/A+B) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

onde: *A* e *B* (Áreas dos enantiômeros)

Para o 1-fenil-etanol obtido na reação de redução com 100 μ L de acetofenona com fermento de pão Biox, obteve-se uma área de 66% para o pico com $t_R = 8,57$

minutos e uma área de 34% para o pico com tempo de retenção de 8,84 minutos. Aplicando-se esses valores na **Equação 1**, e.e. (%) = $(66-34 / 66+34) \times 100$, obteve-se o valor de e.e. = 32% (**Figura 17**).

Para o 1-fenil-etanol obtido na reação de redução com 200 µL de acetofenona com fermento de pão Biox, obteve-se uma área de 72% para o pico com $t_R = 8,57$ minutos e uma área de 28% para o pico com tempo de retenção de 8,84 minutos. Aplicando-se esses valores na **Equação 1**, e.e. (%) = $(72-28 / 72+28) \times 100$, obteve-se um valor de e.e. = 44% (**Figura 17**).

A determinação da configuração absoluta (*R* ou *S*), para enantiômeros descritos na literatura, pode ser realizada através da medida da rotação ótica do composto obtido experimentalmente em um polarímetro. Assim, é possível comparar o valor do sinal de rotação ótica obtido experimentalmente com aquele registrado na literatura para o composto conhecido.⁸

O desvio da luz polarizada circulante é uma propriedade física e exclusiva dos enantiômeros. O enantiômero que desvia a luz polarizada circulante para a direita é atribuído o sinal (+) e a substância (enantiômero) é denominada de dextrorrotatória. O enantiômero que desvia a luz polarizada circulante para a esquerda é atribuído o sinal (-) e a substância é denominada de levorrotatória.⁸

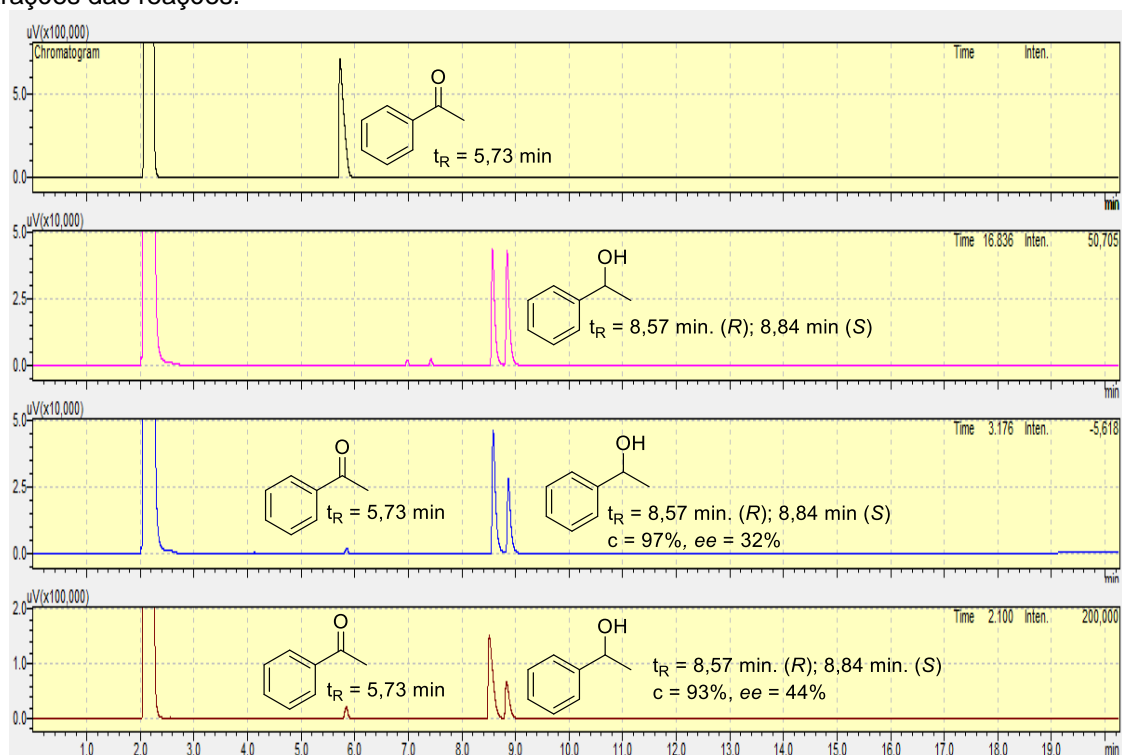
Em nosso estudo não se realizou a medida da rotação ótica, pois o 1-fenil-etanol não foi purificado por cromatografia em coluna, uma vez que tinha uma pequena quantidade de acetofenona (3%) na reação com 100 µL e 7% de acetofenona na reação com 200 µL.

Porém, no laboratório esse álcool já foi estudado e obteve-se a medida de rotação ótica e desta forma, já era de conhecimento que primeiro pico ($t_R = 8,57$ min.) correspondeu ao enantiômero *R* do álcool e o segundo pico ($t_R = 8,84$ min.) correspondeu ao enantiômero *S*. Portanto, concluiu-se que a enzima álcool desidrogenase, assistida pelo cofator NADH ou NADPH, presente no fermento de pão, favoreceu preferencialmente a formação do (+)-(*R*)-1-fenil-etanol. Por exclusão, o enantiômero obtido em menor proporção correspondeu ao (-)-(*S*)-1-fenil-etanol.

Dados da literatura em que se realizou a redução também da acetofenona com fermento de pão seco, produziu como produto o (+)-(*R*)-1-fenil-etanol.¹² Neste caso, as células da levedura *in natura* úmida foram dispersas em mistura de sílica sol pré-sintetizada e tampão fosfato, e posteriormente processadas para a obtenção do fermento encapsulado em sílica gel com suas células aderidas nos poros do material sintetizado.¹²

A reação de redução da acetofenona com 200 μL com o fermento de pão Biox, apresentou um valor de excesso enantiomérico (*e.e.* = 44%) um pouco melhor que a reação com 100 μL (*e.e.* = 32%). Ainda, a reação foi realizada com o dobro de massa de acetofenona e a conversão também foi bastante significativa (*c* = 93%).

Figura 17 - Cromatogramas obtidos por CG-FID com coluna quiral de ciclodextrina. (A) Padrão da acetofenona. (B) Padrão do 1-fenil-etanol racêmico. (C) Reação de redução com fermento de pão Biox da acetofenona (100 μL , 24 h, temperatura ambiente). (D) Reação de redução com fermento de pão Biox da acetofenona (200 μL , 24 h, temperatura ambiente). As análises foram realizadas após as extrações das reações.



Condições cromatográficas: volume de injeção 1,0 μL , temperatura de injeção 250°C, modo de injeção split, razão split 1:10, gás carreador: N_2 , modo de controle de fluxo: pressão, pressão: 69,0 kPa, fluxo total: 11,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, fluxo na coluna 0,73 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, velocidade linear 24,1 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, fluxo de purga 3,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, coluna quiral CP-Chirasil-DEX CB 25,0m x 0,25 mm x 0,25 μm , temperatura inicial 120°C por 2 minutos, taxa de aquecimento: 4°C. min^{-1} por 11 minutos, temperatura final 165°C, temperatura de detecção 350°C.

Fonte: Autoria própria.

Na **Figura 18** observou-se no cromatograma que a *p*-cloro-acetofenona, que foi o reagente de partida e obtida comercialmente da Sigma-Aldrich, apresentou um tempo de retenção de 11,55 minutos. Na análise do álcool racêmico, o (±)-*p*-cloro-1-fenil etanol, obtido via redução com boro-hidreto de sódio, ocorreu uma boa separação dos pares de enantiômeros na coluna quiral utilizada. O enantiômero (*R*^{*})-1-fenil-etanol apresentou um tempo de retenção de 15,51 minutos e seu par enantiomérico, o (*S*^{*})-1-fenil-etanol um tempo de retenção de 15,77 minutos de acordo com as análises por CG-FID.

Observação: Não foi possível, até o presente momento, determinar se o 1º pico correspondeu ao enantiômero do (*R*^{*})-1-fenil-etanol e o 2º pico ao enantiômero (*S*^{*})-1-fenil-etanol. Assim, atribuiu-se empiricamente que o 1º pico correspondeu ao enantiômero *R* e o 2º pico ao enantiômero *S*. Nestes casos utilizou-se o asterisco (*). Em geral, enantiômeros de uma mesma série química, tendem a seguir um mesmo padrão de separação enantiomérica quando analisados na mesma coluna quiral e nas mesmas condições.

Para o *p*-cloro-1-fenil-etanol obtido na reação de redução com 100 µL de *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão Biox, obteve-se uma área de 82% para o pico com $t_R = 15,77$ minutos e uma área de 18% para o pico com tempo de retenção de 15,51 minutos. Aplicando-se esses valores na **Equação 1**, $e.e. (\%) = (82 - 18) / (82 + 18) \times 100$, obteve-se o valor de $e.e. = 64\%$. A conversão da *p*-cloro-acetofenona no correspondente *p*-cloro-1-fenil-etanol foi de 80%.

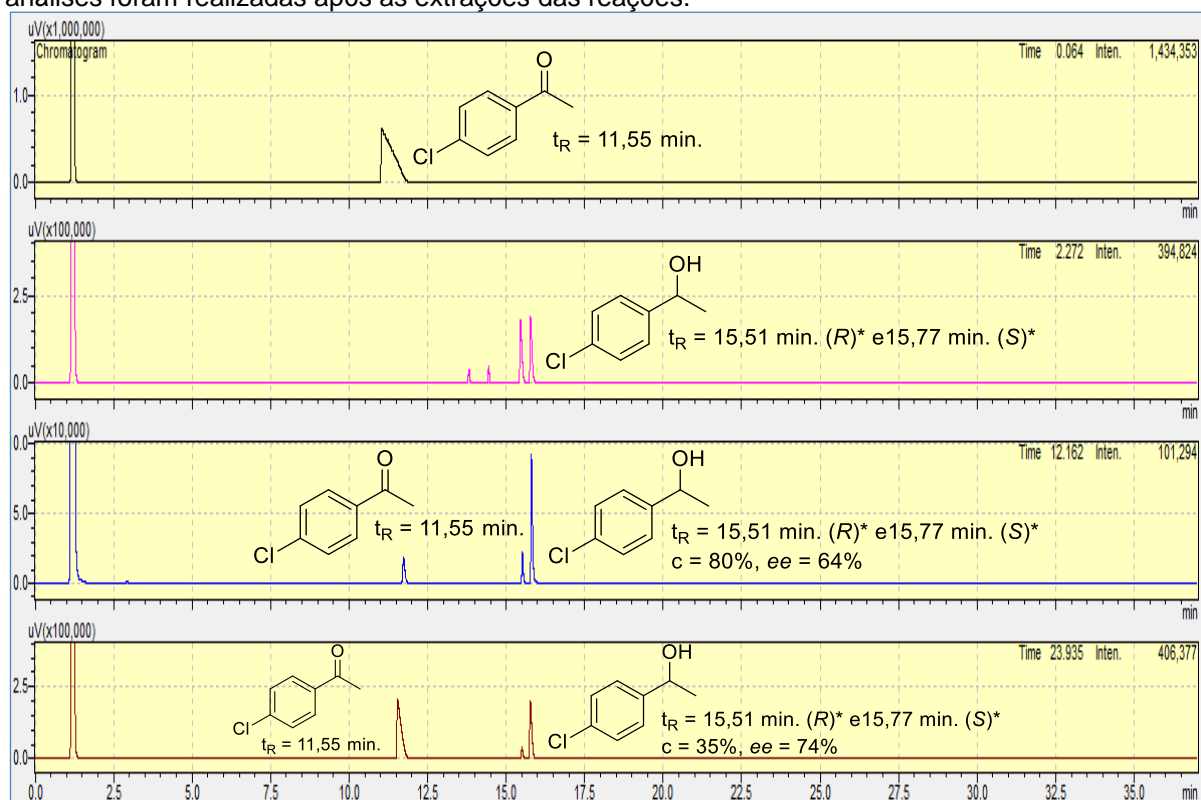
Para o *p*-cloro-1-fenil-etanol obtido na reação de redução com 200 µL de *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão Biox, obteve-se uma área de 87% para o pico com $t_R = 15,77$ minutos e uma área de 13% para o pico com tempo de retenção de 15,51 minutos. Aplicando-se esses valores na **Equação 1**, $e.e. (\%) = (87 - 13) / (87 + 13) \times 100$, obteve-se um valor de $e.e. = 74\%$. A conversão da *p*-cloro-acetofenona no correspondente *p*-cloro-1-fenil-etanol foi de 35%.

Destaca-se que quando dobrou a quantidade de reagente, ou seja, da *p*-cloro-acetofenona de 100 µL para 200 µL, ocorreu um decréscimo significativo da conversão. E, em relação a configuração absoluta (*R* ou *S*) ainda não foi determinada para o produto de redução, o *p*-cloro-1-fenil-etanol. Contudo, destaca-se que enantiômero majoritário da redução da acetofenona, foi o oposto na redução com a

p-cloro-acetofenona com o fermento de pão Biox, inferindo-se que estes alcoóis têm configuração absoluta opostas.

A redução biocatalítica da *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão também foi aplicada na aula de ensino de laboratório de Química Orgânica (**ANEXO**).

Figura 18 - Cromatogramas obtidos por CG-FID com coluna quiral de ciclodextrina. (A) Padrão da *p*-cloro-acetofenona. (B) Padrão do *p*-cloro-1-fenil-etanol racêmico. (C) Reação de redução com fermento de pão Biox da *p*-cloro-acetofenona (100 μ L, 24 h, temperatura ambiente). (D) Reação de redução com fermento de pão da *p*-cloro-acetofenona (200 μ L, 24 h, temperatura ambiente). As análises foram realizadas após as extrações das reações.



Condições cromatográficas: volume de injeção 1,0 μ L, temperatura de injeção 250°C, modo de injeção split, razão split 1:10, gás carreador: N₂, modo de controle de fluxo: pressão, pressão: 69,0 kPa, fluxo total: 11,1 mL.min⁻¹, fluxo na coluna 0,73 mL.min⁻¹, velocidade linear 24,1 cm.s⁻¹, fluxo de purga 3,0 mL.min⁻¹, coluna quiral CP-Chirasil-DEX CB 25,0m x 0,25 mm x 0,25 μ m, temperatura inicial 120°C por 2 minutos, taxa de aquecimento: 4°C.min⁻¹ por 11 minutos, temperatura final 165°C, temperatura de detecção 350°C.

Fonte: Autoria própria.

4.3. Caracterização dos reagentes (cetonas) e produtos (alcoóis) por Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e Infravermelho (IV)

4.3.1. Caracterização por CG-EM

Nesta etapa para a caracterização, realizou-se as análises dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (**Figuras 19-21**) Após a injeção no detector de massas, os analitos foram ionizados e imediatamente fragmentados. Os fragmentos assim obtidos foram separados e analisados com base em sua relação massa carga (m/z). A seguir estão mostrados os cromatogramas dos compostos analisados e seus espectros de massas, respectivamente.

a) Acetofenona

Foi adquirido o cromatograma e o espectro de massas da acetofenona. Na biblioteca NIST do equipamento obteve-se 97% de similaridade (**Figura 19**).

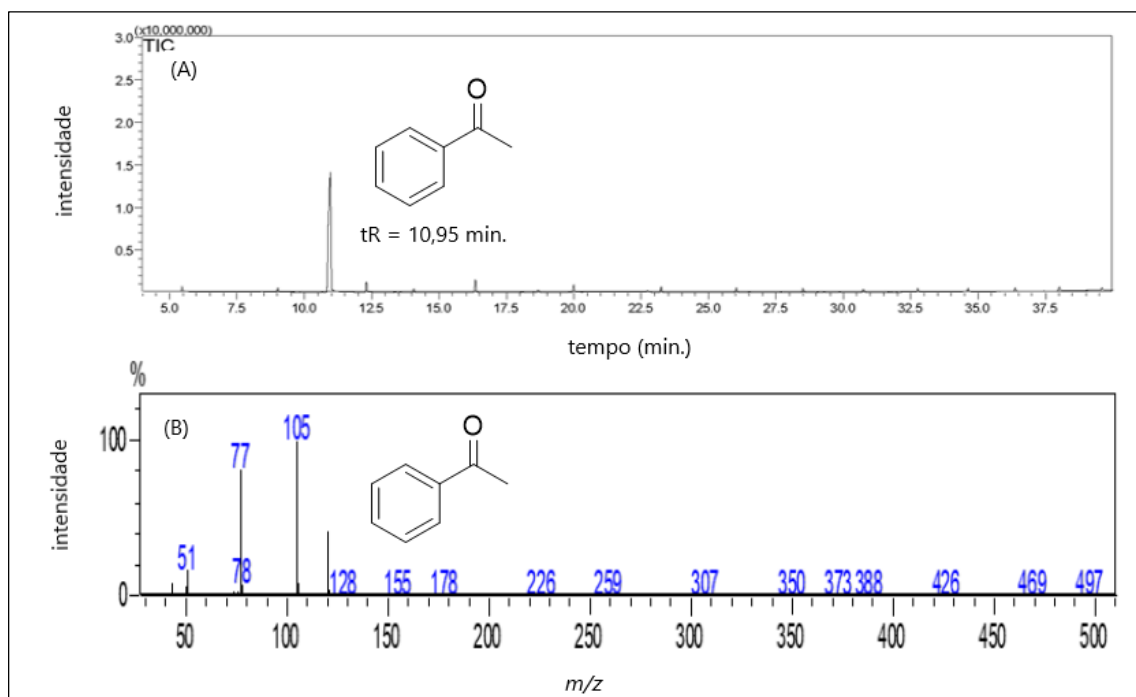
A acetofenona tem fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$, massa molecular de 120 g/mol e é um líquido incolor de odor pungente à temperatura ambiente.

Os fragmentos detectados com maior abundância corresponderam aos valores de m/z 105 e m/z 77.

O pico base (100%) com m/z 105 correspondeu ao fragmento do tipo $[\text{M}-15]^+$, isto é, o fragmento gerado pela perda de um radical metila ($-\text{CH}_3$) pela molécula da acetofenona.

Já o pico com m/z 77 correspondeu ao fragmento do tipo $[\text{M}-43]^+$, isto é, o fragmento gerado pela perda do substituinte radicalar do tipo ($-\text{CH}_3\text{CO}\cdot$) pela molécula da acetofenona.

Figura 19 - (A) Cromatograma obtido por CG-EM da acetofenona. **(B)** Espectro de massas da acetofenona (IE, 70 eV).



Fonte: Autoria própria.

b) *p*-Cloro-acetofenona

Foi adquirido o cromatograma e o espectro de massas da *p*-cloro-acetofenona. Na biblioteca NIST do equipamento obteve-se 97% de similaridade. (**Figura 20**).

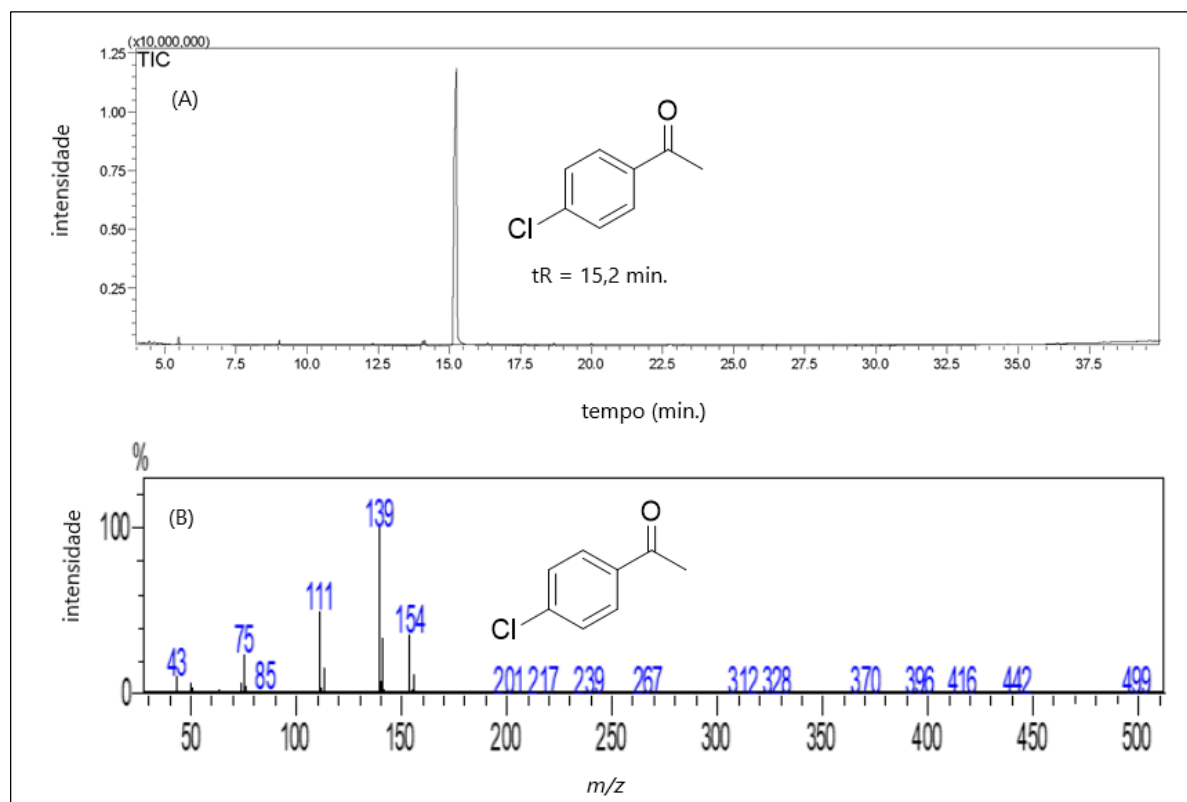
A *p*-cloro-acetofenona tem fórmula molecular C_8H_7ClO , massa molecular de 154 g/mol e é um líquido incolor à temperatura ambiente.

Os fragmentos detectados com maior abundância corresponderam aos valores m/z 154, m/z 139 e m/z 111.

O pico com m/z 154 correspondeu ao íon molecular $[C_8H_7ClO]^+$. O pico base (100%) em 139 é do tipo $[M-15]^+$, resultante da eliminação de um radical metila da *p*-cloro acetofenona.

O pico com m/z 111 correspondeu ao fragmento do tipo $[M-43]^+$, isto é, o fragmento gerado pela perda do substituinte radicalar do tipo $(-COCH_3\cdot)$ pela molécula da *p*-cloro-acetofenona.

Figura 20 - (A) Cromatograma obtido por CG-EM da *p*-cloro-acetofenona. **(B)** Espectro de massas da *p*-cloro-acetofenona (IE, 70 eV).



Fonte: Autoria própria.

c) 1-Fenil-etanol ou metilfenil carbinol

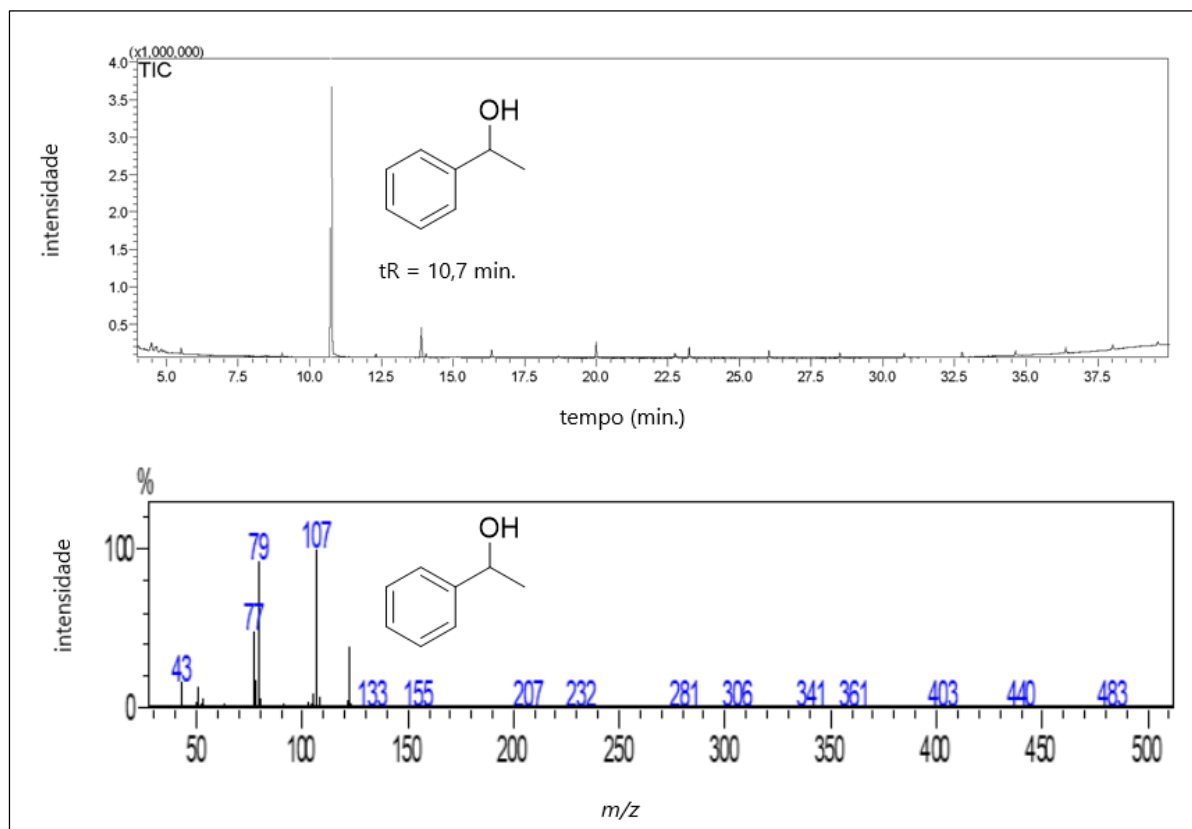
Foi adquirido o cromatograma e o espectro de massas da 1-fenil-metanol. Na biblioteca NIST do equipamento e obteve-se 97% de similaridade (**Figura 21**).

O 1-fenil-etanol tem fórmula molecular $C_8H_{10}O$, massa molecular de 122 g/mol e é um líquido incolor à temperatura ambiente.

Os fragmentos mais abundantes foram os que apresentam m/z 122, m/z 107, m/z 79 e m/z 77.

O pico m/z 122 correspondeu ao íon molecular $[C_8H_{10}O]^+$. O fragmento m/z 107, correspondeu ao íon formado pela perda de um radical metila, seguida da perda de um hidrogênio. O pico base (100%) com m/z 77 correspondeu ao fragmento $[M-45]^+$.

Figura 21 - (A) Cromatograma obtido por CG-EM do 1-fenil-etanol. **(B)** Espectro de massas do 1-fenil-etanol (IE, 70 eV).



Fonte: Autoria própria.

d) *p*-Cloro-1-fenil-etanol

Foi adquirido o cromatograma e o espectro de massas do *p*-cloro-1-fenil-etanol. Na biblioteca NIST do equipamento obteve-se 94% de similaridade (**Figura 22**).

O *p*-cloro-1-fenil-etanol tem fórmula molecular C_8H_9ClO , massa molecular de 156 g/mol e é um líquido incolor à temperatura ambiente.

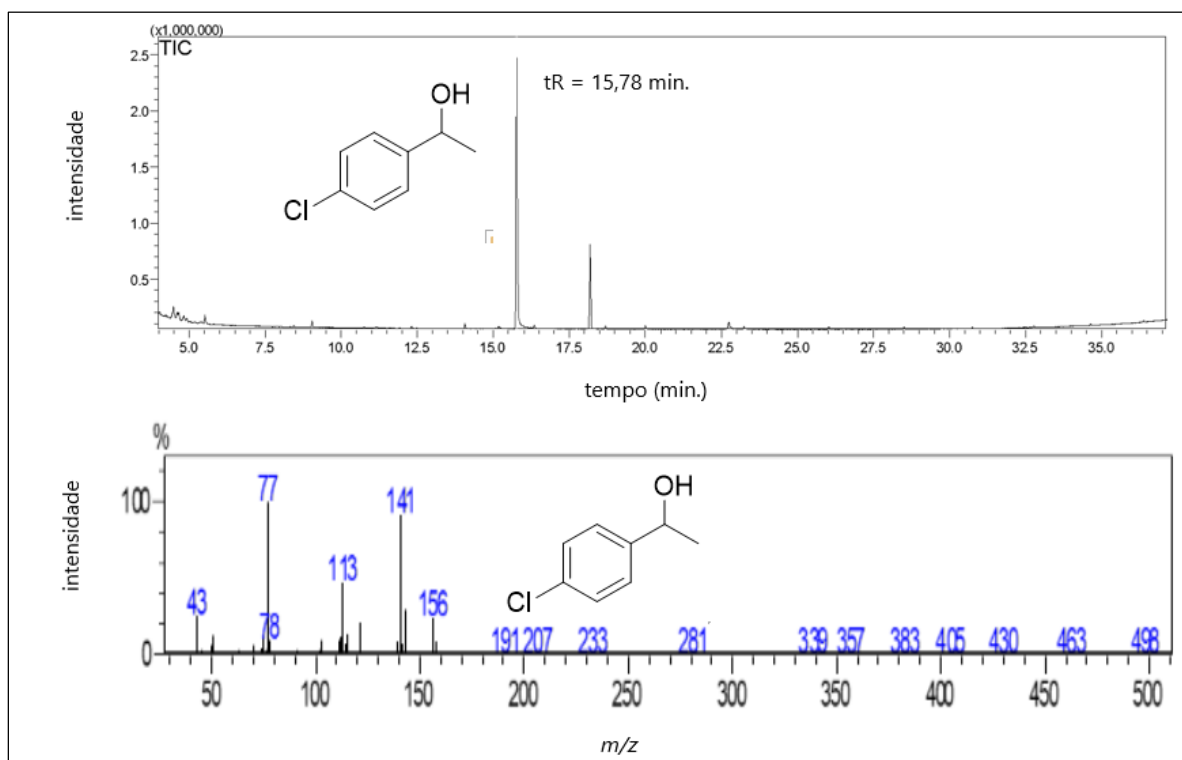
No cromatograma detectou-se o *p*-cloro-1-fenil-etanol no tempo de retenção de 15,78 minutos e também apresentou uma impureza com o tempo de detecção próximo de 18 minutos.

Os fragmentos mais abundantes no espectro de massas do *p*-cloro-1-fenil-etanol corresponderam aos valores de m/z 156, m/z 141, m/z 77 e m/z 113.

O pico com m/z 156 correspondeu ao íon molecular $[C_8H_9ClO]^+$. O pico m/z 141 correspondeu ao fragmento $[M-15]^+$ correspondente à perda do radical metila ($-CH_3$).

O valor de m/z 77 correspondeu ao íon aromático sem substituintes $[C_6H_5]^+$. E o pico m/z 113 correspondeu o fragmento $[M-C_2H_4O]^+$, ou seja grupo substituinte contendo a hidroxila ($-CH(OH)-CH_3$).

Figura 22 - (A) Cromatograma obtido por CG-EM do *p*-cloro1-fenil-etanol. **(B)** Espectro de massas do *p*-cloro1-fenil-etanol (IE, 70 eV).

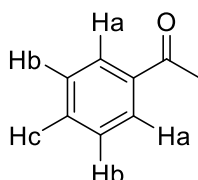


Fonte: Autoria própria.

4.3.2. Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C

Nas **Figuras 23-30** tem-se os espectros de RMN da acetofenona, da *p*-cloroacetofenona, do 1-fenil-etanol e do *p*-cloro-1-fenil-etanol.

a) Acetofenona



RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)

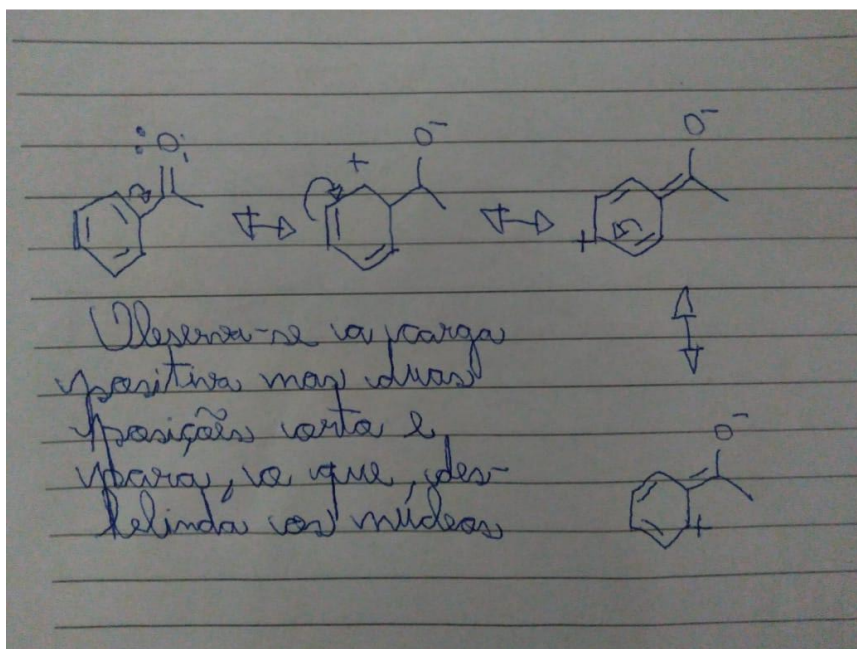
Na região de 7,96 ppm tem-se um multiplete correspondente aos dois hidrogênios quimicamente e magneticamente equivalentes na posição *orto* do anel aromático (**Ha**), na região de 7,59-7,54 ppm tem-se um multiplete referente ao hidrogênio na posição *para* do anel aromático (**Hc**) e em 7,48-7,44 ppm tem-se um multiplete referente aos dois hidrogênios na posição *meta* do anel aromático.

As posições *orto* e *para* são as mais desblindadas devido aos efeitos de ressonância retirador de elétrons do grupo carbonila, bem como por efeito indutivo também retirador de elétrons do substituinte acetila ($-\text{COCH}_3$). Pode-se observar-se que as cargas positivas se encontram localizadas nas posições *orto* e *para* do anel aromático nas estruturas de ressonância representadas no **Esquema 4**.

Finalmente, em 2,41 ppm um singlete que integra para três hidrogênios correspondentes ao grupo metila ($-\text{CH}_3$).

Em 7,26 ppm tem-se um sinal singlete devido a troca de deutério (CDCl_3) por um próton (CHCl_3). Neste caso, refere-se ao sinal do próton.

Esquema 4 - Algumas representações de estruturas de ressonância da acetofenona.



Fonte: Autoria própria.

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados um total de 6 linhas espectrais que corresponderam exatamente aos 8 átomos de carbono da molécula. Em 198,2 ppm o sinal referente à carbonila ($-\text{C}=\text{O}$), em 137,1 ppm o carbono *ipso* ligado ao grupo acetila (C_o), em 133,1 ppm o carbono em posição *para* do anel aromático.

Em 128,6 os carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes em posição *orto* do anel aromático, em 128,3 os carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes em posição *meta* do anel aromático e em 26,6 ppm a metila ligada ao grupo carbonílico ($-\text{CO}-\text{CH}_3$).

Em 77,0 ppm tem-se um sinal tripleto devido o acoplamento do deutério (CDCl_3) com o núcleo de carbono-13.

Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da acetofenona.

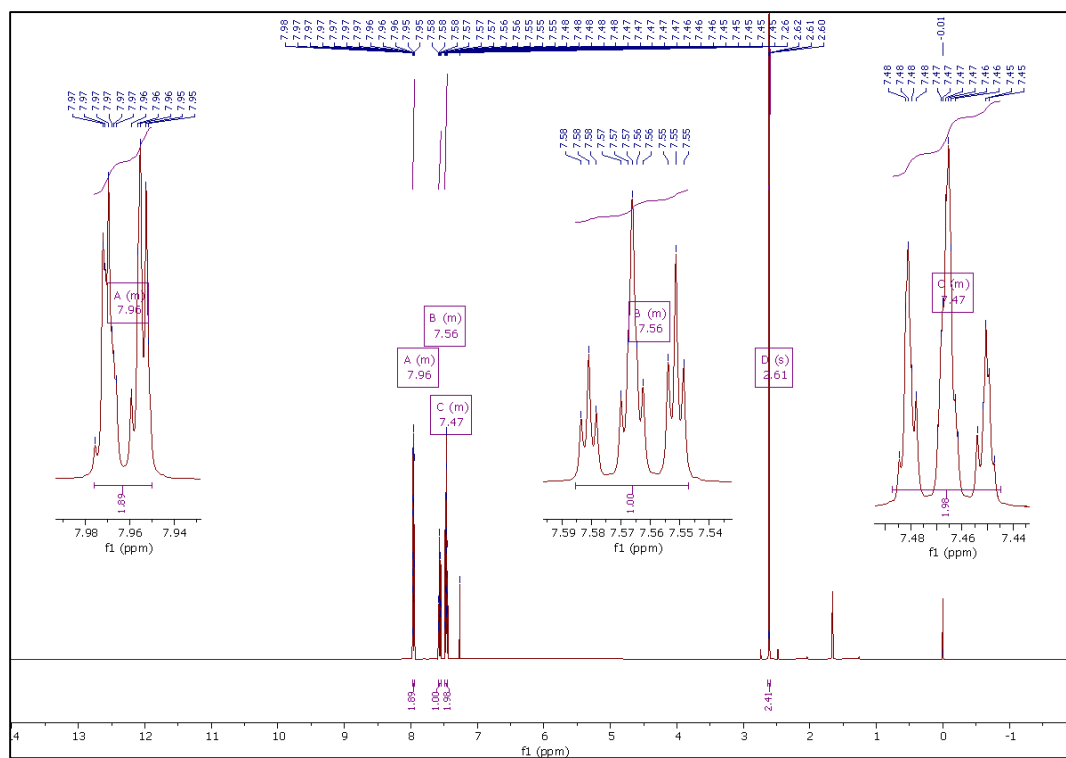
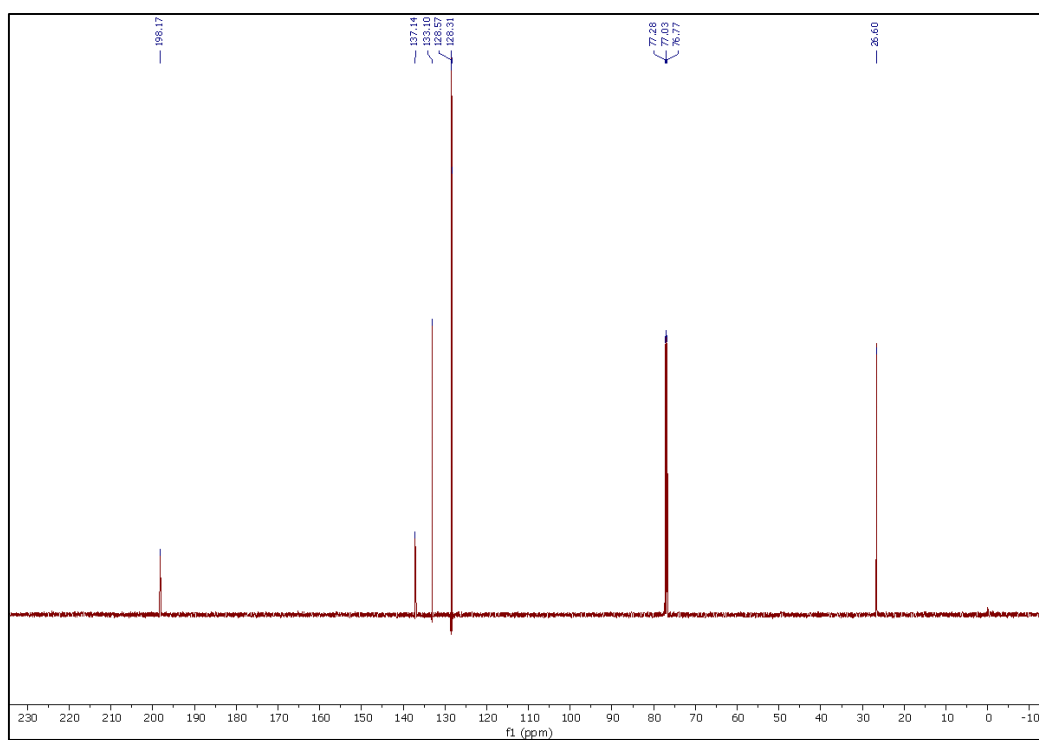
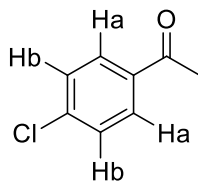


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da acetofenona.



b) *p*-Cloro-acetofenona



RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)

Em 7,90 ppm um dubleto que integra para dois hidrogênios e com constante de acoplamento de $J = 5,0$ Hz que corresponderam aos dois hidrogênios (**Ha**). Em 7,44 ppm um dubleto que integra para dois hidrogênios e com constante de acoplamento de $J = 5,0$ Hz que corresponde aos dois hidrogênios (**Hb**).

Os hidrogênios **Ha** e **Hb** têm os mesmos acoplamentos (denominados de acoplamentos *orto*) e são muito característicos de núcleos aromáticos benzenoides com grupos substituintes em posição *para* do anel aromático.

Finalmente, em 2,74 ppm um singlete que integra para três hidrogênios correspondentes ao grupo metila ($-\text{CH}_3$).

Em 7,26 ppm tem-se um sinal singlete devido a troca de deutério (CDCl_3) por um próton (CHCl_3). Neste caso, refere-se ao sinal do próton.

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados um total de 6 linhas espectrais que corresponderam exatamente aos 8 átomos de carbono da molécula. Em 196,8 ppm o sinal referente à carbonila, em 139,6 ppm o carbono *ipso* ligado átomo de cloro no anel aromático e em 135,4 o carbono *ipso* ligado ao grupo acetila.

Em 129,7 os dois carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes vizinhos do grupo acetila, em 135,4 ppm o carbono *ipso* do anel aromático ligado ao grupo acetila, em 128,9 os dois carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes vizinhos em relação ao átomo de cloro. Em 26,6 ppm a metila ligada ao grupo carbonílico ($-\text{CO}-\text{CH}_3$).

Em 77,0 ppm tem-se um sinal tripleto devido o acoplamento do deutério (CDCl_3) com o núcleo de carbono-13.

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da *p*-cloro-acetofenona.

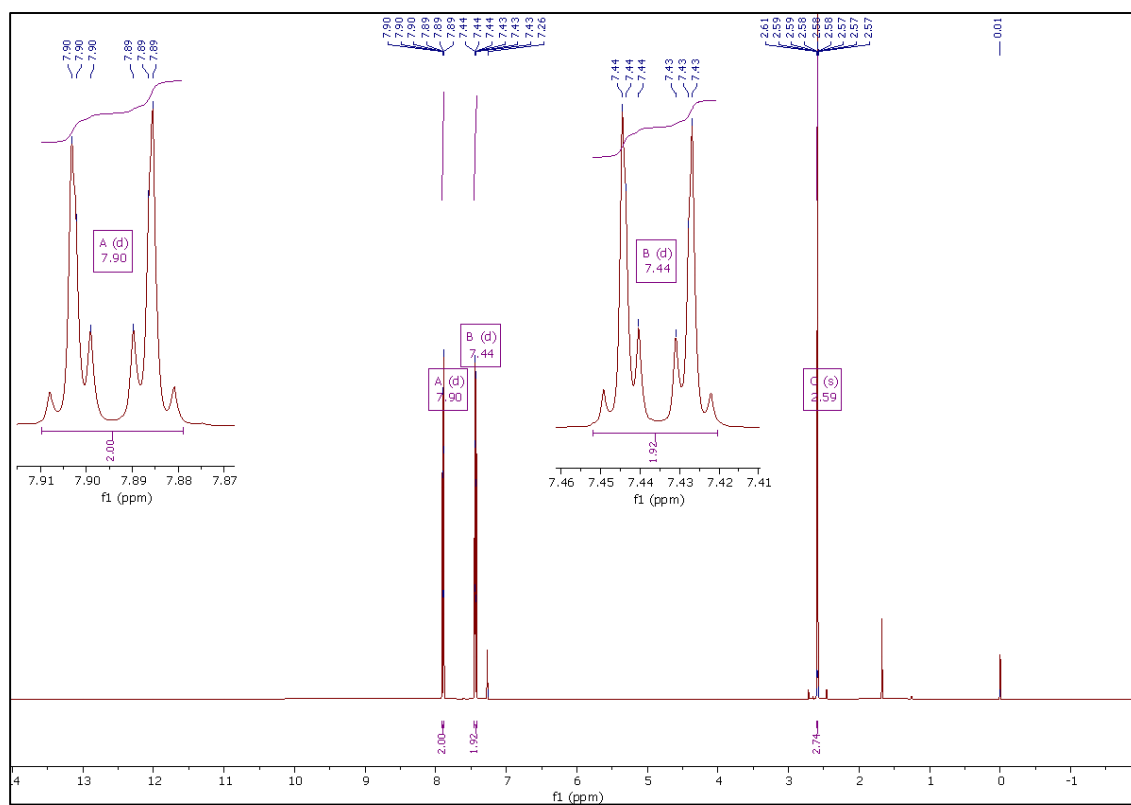
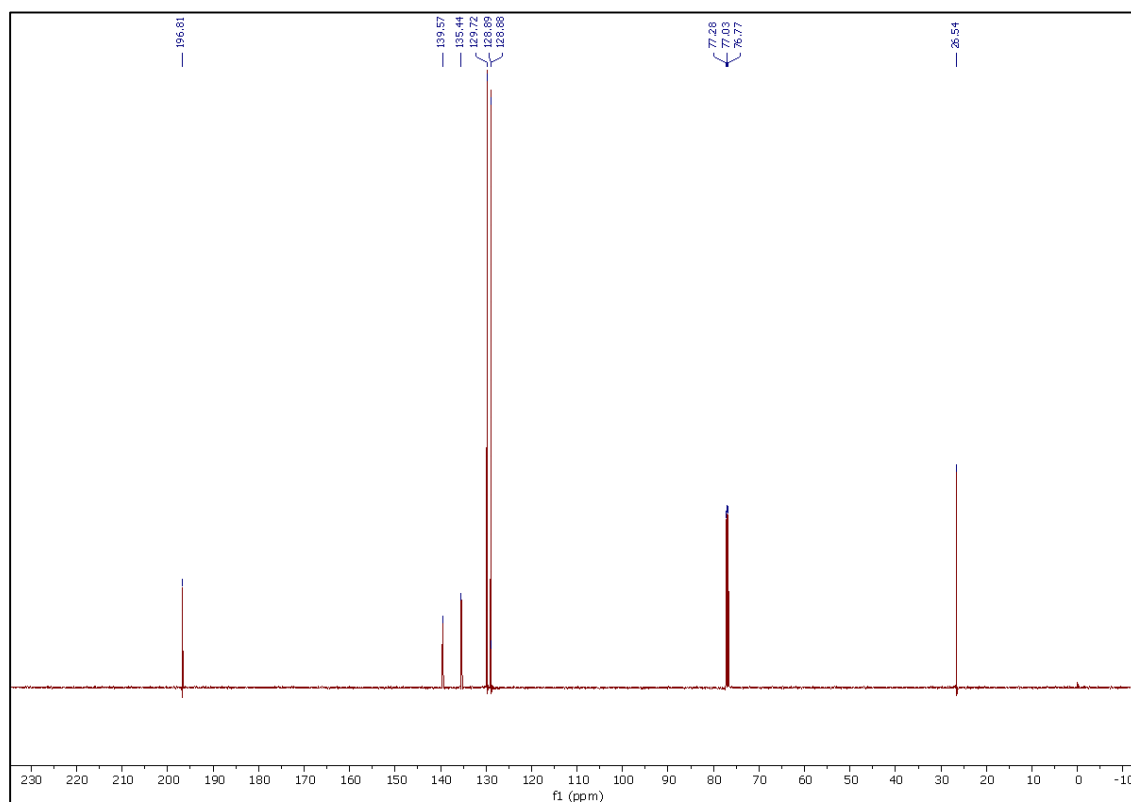
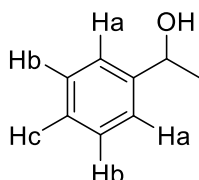


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da *p*-cloro-acetofenona.



c) 1-Fenil-etanol



RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃)

Na região de 7,40-7,30 ppm tem-se um multiplete correspondente a quatro hidrogênios nas posições *orto* e *para* do núcleo aromático benzenoide. Na região de 7,30-7,25 ppm tem-se um multiplete correspondente a um hidrogênio na posição *meta* do núcleo aromático benzenoide. Em 4,88 ppm tem-se um quarteto que integra para 1 hidrogênio com constante de acoplamento de $J = 6,45$ Hz que se refere ao hidrogênio metínico-carbinólico (-CH-OH).

Em 1,49 ppm um dubleto que integra para 3 hidrogênios, com constante de acoplamento de $J = 6,45$ Hz, que se referem aos três hidrogênios do grupo metila (-CH₃). Em ~1,80 ppm tem-se um singlete largo do hidrogênio ligado ao oxigênio (-OH).

Em 7,26 ppm tem-se um sinal singlete devido a troca de deutério (CDCl₃) por um próton (CHCl₃). Neste caso, refere-se ao sinal do próton.

RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃)

No espectro de RMN de ¹³C foram observados um total de 6 linhas espectrais que corresponderam exatamente aos 8 átomos de carbono da molécula. Em 145,8 ppm o sinal referente ao carbono *ipso* do anel aromático ligado ao grupo acetila (C_o).

Em 128,5 dois carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes em posição *orto* do anel aromático e em 127,5 ppm o carbono na posição *para* do anel aromático.

Em 125,4 dois carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes em *meta* do anel aromático, em 70,4 ppm o carbono ligado ao grupo hidroxila (-CH-OH) e em 25,2 ppm a metila ligada ao grupo carbonílico (-CO-CH₃).

Em 77,0 ppm tem-se um sinal tripleto devido o acoplamento do deutério (CDCl₃) com o núcleo de carbono-13.

Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 1-fenil-etanol.

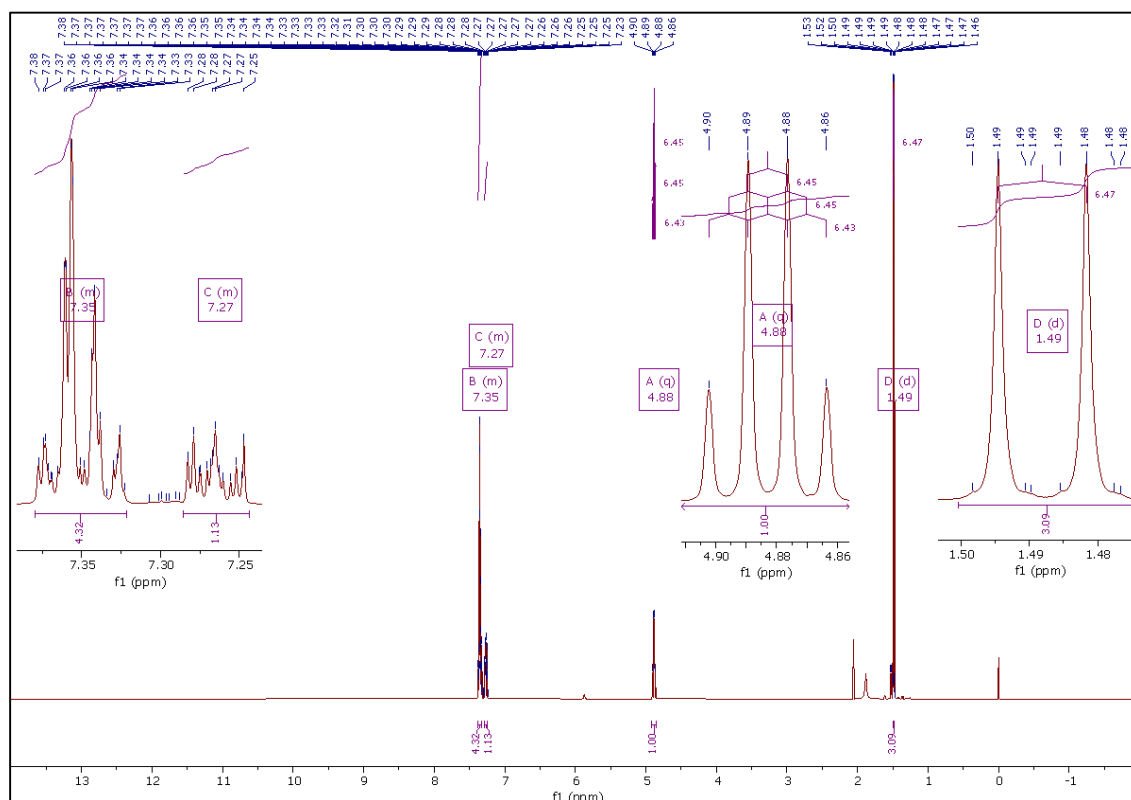
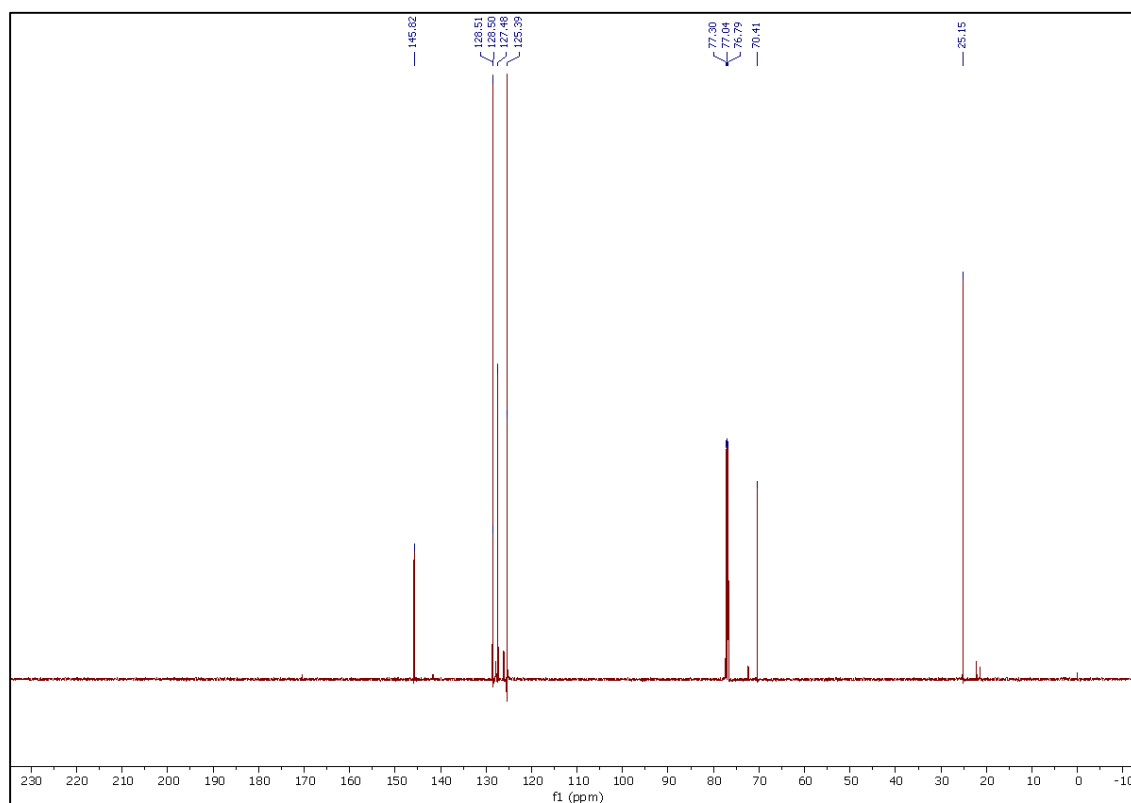
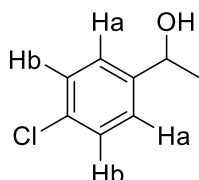


Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do 1-fenil-etanol.



d) *p*-Cloro-1-fenil-etanol



RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)

Na região de 7,31-7,29 ppm tem-se um multiplete correspondente aos quatro hidrogênios do núcleo aromático benzenoide da molécula. Em 4,87 ppm tem-se um quarteto que integra para 1 hidrogênio com constante de acoplamento de $J = 6,45$ Hz que se refere ao hidrogênio metínico-carbinólico ($-\text{CH}-\text{OH}$).

Em 1,47 ppm tem-se um dubleto que integra para 3 hidrogênios, com constante de acoplamento de $J = 6,45$ Hz, que se referem aos hidrogênios do grupo metila ($-\text{CH}_3$). Em $\sim 1,80$ ppm tem-se um singlete largo do hidrogênio ligado ao oxigênio ($-\text{OH}$).

Em 7,26 ppm tem-se um sinal singlete devido a troca de deutério (CDCl_3) por um próton (CHCl_3).

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3)

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados um total de 6 linhas espectrais que corresponderam exatamente aos 8 átomos de carbono da molécula. Em 144,3 ppm o sinal referente ao carbono *ipso* do anel aromático ligado ao grupo acetila (C_o).

Em 133,1 ppm o carbono *ipso* ligado ao átomo de cloro ligado no anel aromático.

Em 128,6 ppm dois carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes em posição *orto* do anel aromático e em 126,8 ppm dois carbonos quimicamente e magneticamente equivalentes em posição *meta* do anel aromático. Em 69,7 ppm o carbono ligado ao grupo hidroxila ($-\text{CH}-\text{OH}$) e em 25,3 ppm a metila ligada ao grupo carbonílico ($-\text{CO}-\text{CH}_3$).

Em 77,0 ppm tem-se um sinal tripleto devido o acoplamento do deutério (CDCl_3) com o núcleo de carbono-13.

Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do *p*-cloro-1-fenil-etanol.

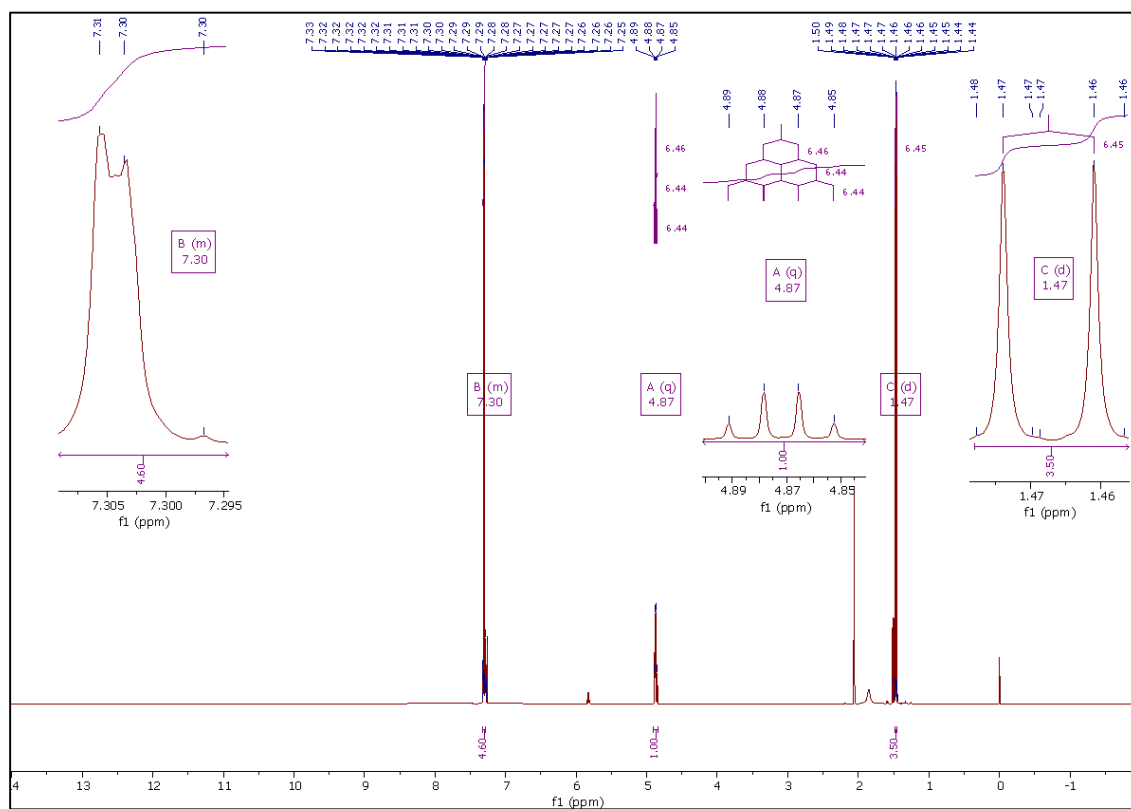
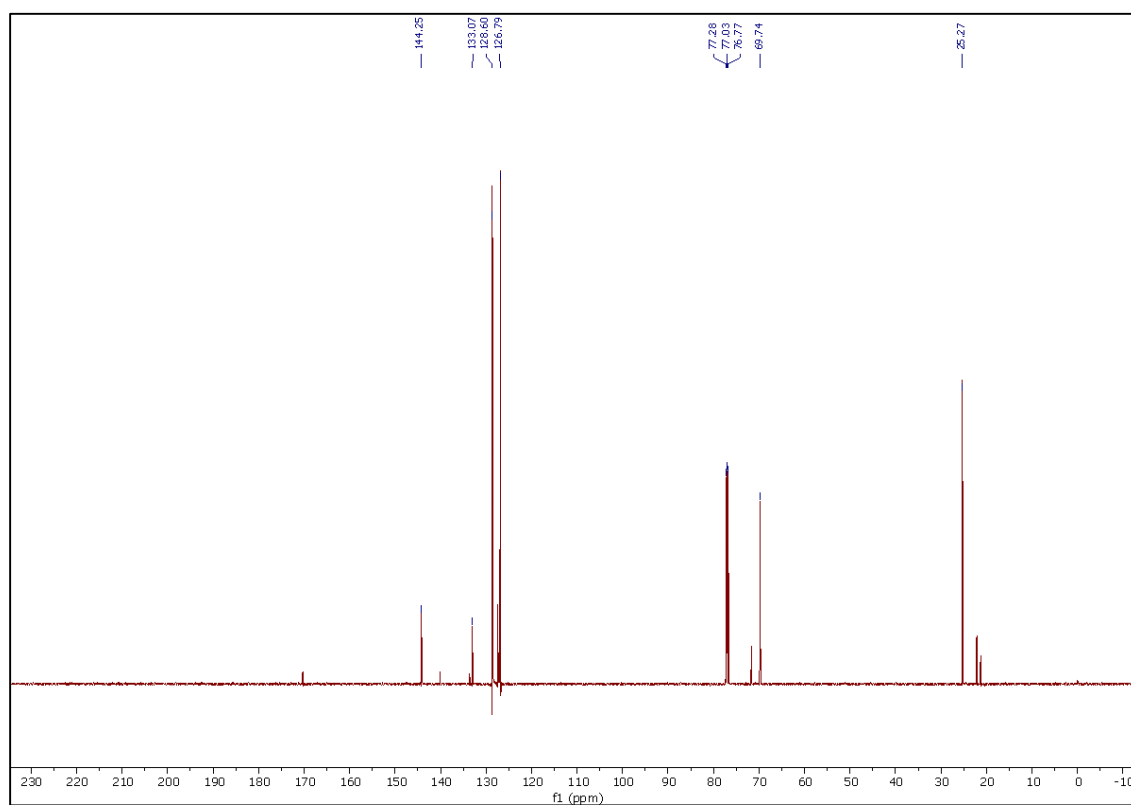


Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do *p*-cloro-1-fenil-etanol.



4.3.3. Caracterização por Infravermelho (IV)

Nas **Figuras de 31-34** tem-se os espectros de IV da acetofenona, da *p*-cloro-acetofenona, do 1-fenil-etanol e do *p*-cloro-1-fenil-etanol.

a) Acetofenona

No espectro de infravermelho da acetofenona, as principais bandas características desse composto foram:

Banda larga de baixa intensidade acima de 3.000 cm^{-1} - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do anel aromático.

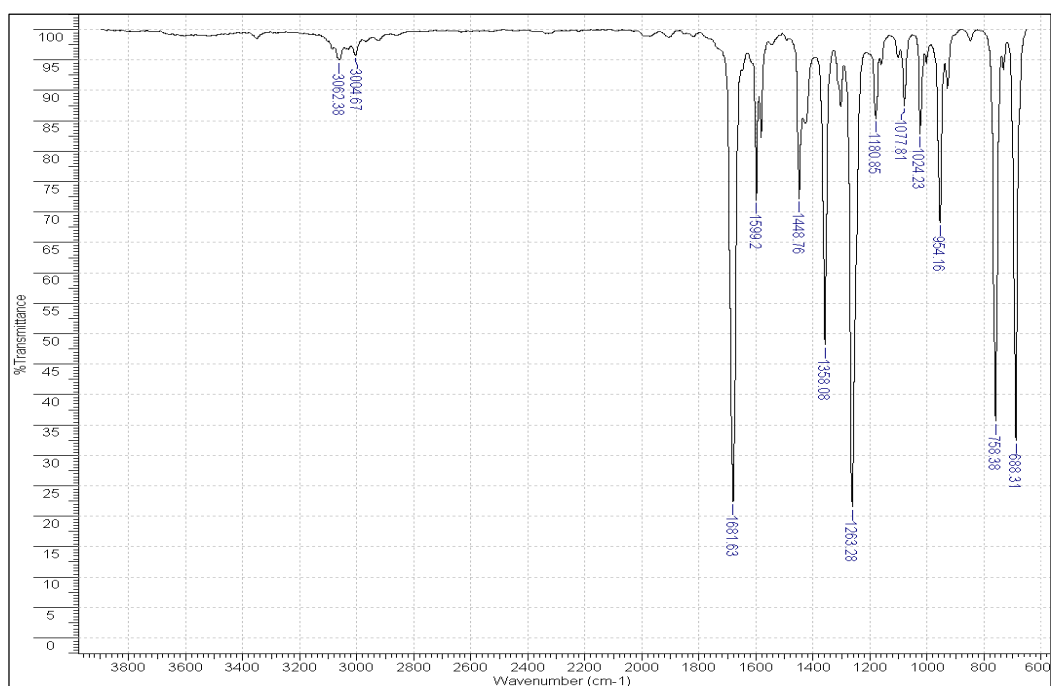
Banda larga de baixa intensidade abaixo de 3.000 cm^{-1} - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do grupo metila.

Banda fina de alta intensidade em 1682 cm^{-1} – Referente ao movimento de vibração do grupo carbonila conjugado com instauração (no caso, o anel benzênico).

Bandas finas e de média intensidade entre 1.400 e 1.600 cm^{-1} – Referente às vibrações das ligações C-C do anel benzênico;

Banda fina de alta intensidade por volta de 1.263 cm^{-1} – Referente ao movimento de dobra das ligações entre os átomos de carbono adjacentes à carbonila e a carbonila.

Figura 31 - Espectro de infravermelho (filme) da acetofenona.



b) *p*-Cloro-acetofenona

No espectro de infravermelho da *p*-cloro-acetofenona, as principais bandas características desse composto foram:

Banda larga de baixa intensidade acima de 3.000 cm⁻¹ - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do anel aromático.

Banda de baixa intensidade abaixo de 3.000 cm⁻¹ - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do grupo metila.

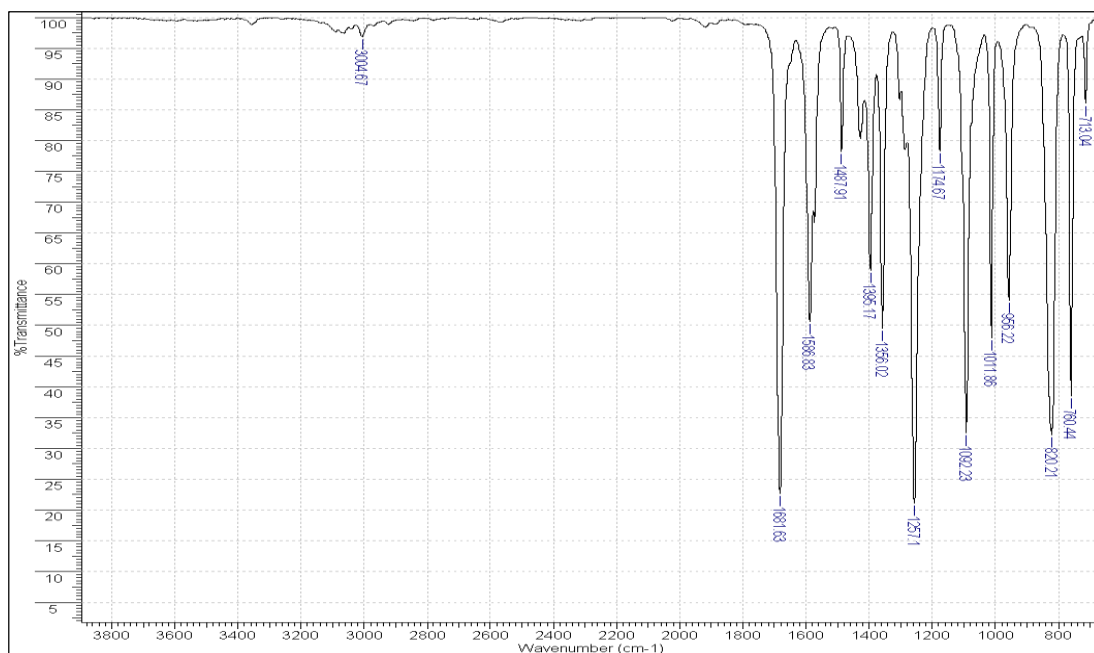
Banda fina de alta intensidade em 1681 cm⁻¹ – Referente ao movimento de vibração do grupo carbonila conjugado com instauração (no caso, o anel benzênico).

Bandas finas e de média intensidade entre 1.400 e 1.600 cm⁻¹ – Referentes às vibrações das ligações C-C do anel benzênico.

Banda fina de alta intensidade por volta de 1.200 cm⁻¹ – Referente ao movimento de dobra das ligações entre os átomos de carbono adjacentes à carbonila e a carbonila.

Banda fina de alta intensidade por volta de 760 cm^{-1} – Referente ao movimento de vibração da ligação entre o átomo de cloro e o anel benzênico.

Figura 32 - Espectro de infravermelho (filme) da *p*-cloro-acetofenona.



c) 1-Fenil-etanol

No espectro de infravermelho do fenil-metil carbinol, as principais bandas características desse composto foram:

Banda larga de média intensidade por volta de 3.300 cm^{-1} - Referente ao movimento de vibração das ligações O-H e interações de hidrogênio características dos álcoois.

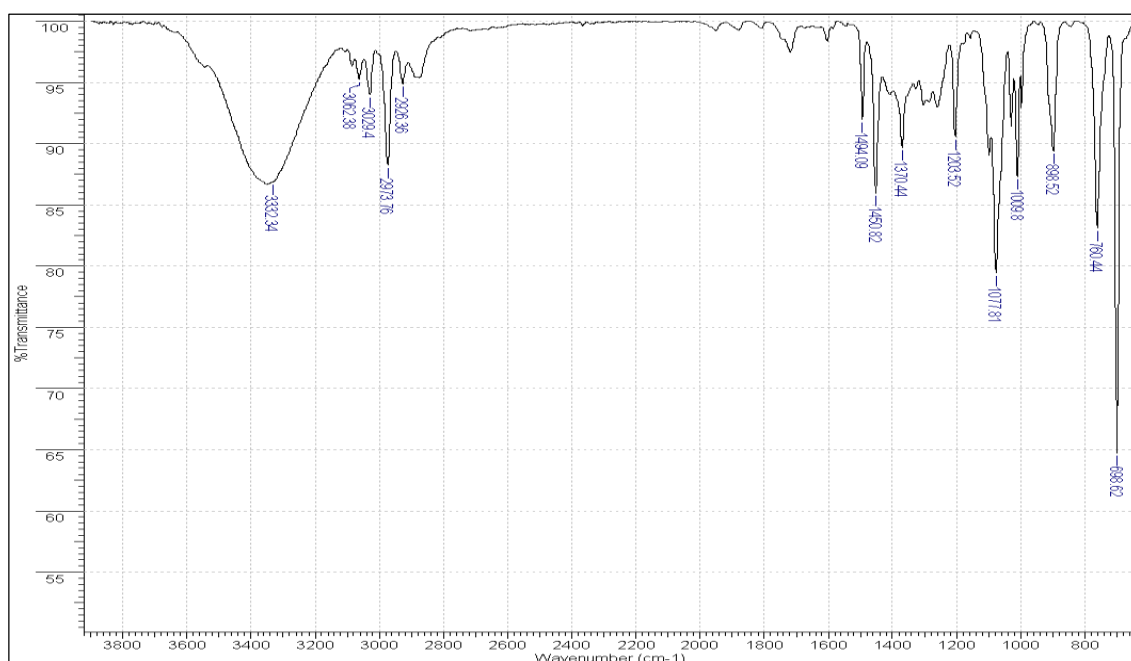
Banda larga de baixa intensidade acima de 3.000 cm^{-1} - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do anel aromático.

Banda fina de baixa intensidade abaixo de 3.000 cm^{-1} - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do grupo metila de do grupo C-H vizinho à metila.

Bandas finas e de média intensidade entre 1.400 e 1.600 cm^{-1} - Referentes às vibrações das ligações C-C do anel benzênico e da ligação C-O-H do grupo hidroxila.

Bandas finas de alta intensidade em 760 cm^{-1} e 699 cm^{-1} - Referentes ao movimento de estiramento das ligações C-H do anel aromático fora do plano.

Figura 33 - Espectro de infravermelho (filme) do 1-fenil-etanol.



c) *p*-Cloro-1-fenil-etanol

No espectro de infravermelho do 4-*p*-cloro-fenil-etanol, as principais bandas características desse composto foram:

Banda larga de média intensidade por volta de 3.300 cm⁻¹ – Referente ao movimento de vibração das ligações O-H e interações de hidrogênio características dos álcoois.

Banda larga de baixa intensidade acima de 3.000 cm⁻¹ - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do anel aromático.

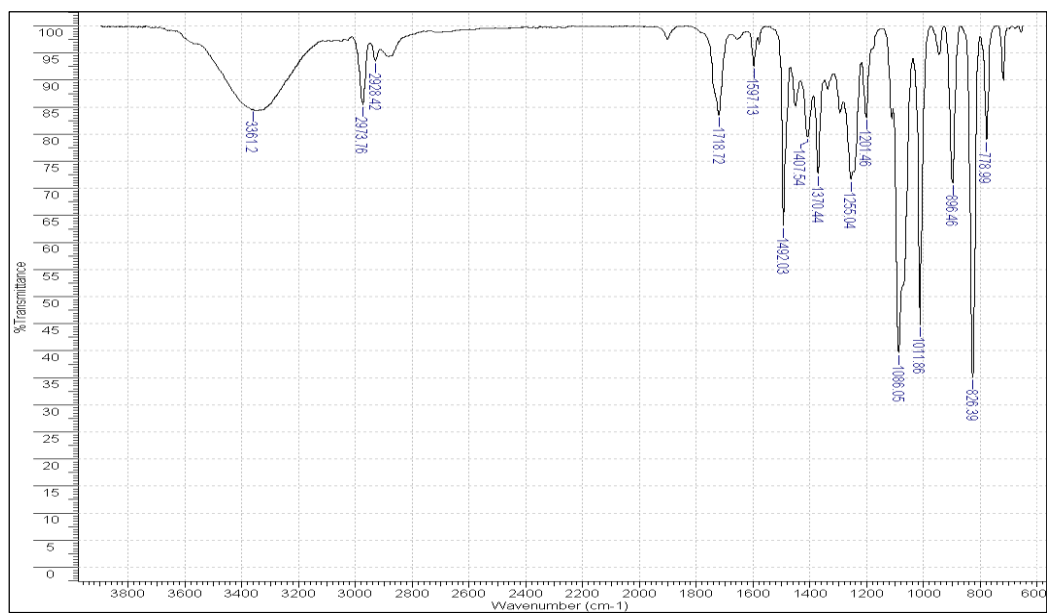
Banda fina de baixa intensidade abaixo de 3.000 cm⁻¹ - Referente ao movimento de estiramento das ligações C-H do grupo metila e do grupo C-H vizinho à metila.

Bandas finas e de média intensidade entre 1.400 e 1.600 cm⁻¹ – Referentes às vibrações das ligações C-C do anel benzênico.

Bandas de alta intensidade em 1086 cm⁻¹, 1012 cm⁻¹ e 1086 de estiramentos das ligações C-O-H do grupo hidroxila.

Banda fina de baixa intensidade por volta de 760 cm^{-1} – Referente ao movimento de vibração da ligação entre o átomo de cloro e o anel benzênico.

Figura 34 - Espectro de infravermelho (filme) do *p*-cloro-1-fenil-etanol.



5. CONCLUSÃO

Com este trabalho, pôde-se notar a eficiência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão Biox) na redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona em seus respectivos alcoóis.

Quando se utilizou o fermento de pão Biox a acetofenona (100 µL) forneceu preferencialmente o (+)-(*R*)-1-fenil-etanol (*c* = 97%, *e.e.* = 32%, 100 µL; *c* = 93%, *e.e.* = 44%, 200 µL). Enquanto que a redução da *p*-cloro-acetofenona forneceu preferencialmente o (*S**)-*p*-cloro-1-fenil-etanol (*c* = 80%, *e.e.* = 64%, 100 µL; *c* = 35%, *e.e.* = 74%, 200 µL).

Destaca-se também a boa estereosseletividade da enzima redutora (álcool desidrogenase) dessa levedura na obtenção dos produtos enantiomericamente enriquecidos, algo que não é possível de ocorrer pelo uso do boro-hidreto de sódio.

Tanto os reagentes quanto os produtos foram inicialmente analisados em plaquinhas de CCD, durante e após as reações, cujas polaridades influenciaram inversamente em seus fatores de retenção. Já as técnicas de separação e identificação desses compostos permitiram estabelecer relações entre suas estruturas moleculares e os resultados obtidos.

Toda a metodologia empregada, desde a montagem das reações até a injeção das amostras dos analitos nos equipamentos, deve ser realizada com cuidado a fim de evitar possíveis contaminações e demais inconvenientes que promovam resultados indesejáveis no trabalho.

Finalmente, este estudo possibilitou a elaboração de uma aula prática para o ensino de graduação na disciplina de Laboratório de Química Orgânica.

6. REFERÊNCIAS

1. Marsaioli, Anita; Porto, André. Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações. Salto, SP: Editora Schoba, 2010.
2. Gonçalves, Regina; Oliveira, Arildo; Gonçalves, Eduardo. Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações: volume 2. São Paulo: Editora Schoba, 2012. 376p.
3. Enzima. Disponível em <https://pt.wikipedia.org/wiki/Enzima#>. Acesso em 10 de Julho de 2023.
4. J. Dubos (1951), "Louis Pasteur: Free Lance of Science, Gollancz." in K.L. Manchester (1995), "Louis Pasteur (1822–1895)-chance and the prepared mind.", Trends in Biotechnology, 13(12), p.511-515.
5. (NELSON, David L.; COX, Michael M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2019, 1278 p.
6. Albuquerque, Patrícia. UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* NA REDUÇÃO DE SUBSTRATOS CARBONÍLICOS. Orientadora: Dra. Maria da Graça Nascimento. 2007. Disponível em <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/90616/240343.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 10 de julho de 2023.
7. Faber, Kurt. Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. 6th edition.2011.
8. Solomons, Graham; Fryhle, Craig. Química Orgânica. 7. Editora LTC.
9. Omori, Álvaro; Portas, Viviane; Oliveira, Camila. REDUÇÃO ENZIMÁTICA DO 4-(DIMETILAMINO)BENZALDEÍDO COM PEDAÇOS DE CENOURA (*Daucus carota*): UM EXPERIMENTO SIMPLES NA COMPREENSÃO DA BIOCATÁLISE. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/JYpnxqWGHkNGxP37qWLFwff/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em 10 de Julho de 2023.
10. Alvesi, Pérciles; Victor, Mauricio. Reação da Cânfora com Boro-hidreto de Sódio: Uma Estratégia para o Estudo da Estereoquímica da Reação de Redução. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/rL4mRyv7x9ZpkhnKzLt3Msg/?lang=pt>. Acesso 3m 10 de Julho de 2023.
11. Carey, Francis. Química Orgânica.7. Editora AMGH. 2011. 764 p.
12. Kato, Katsuya; Nakamura, Hitomi; Nakanishi, Kazuma. Applied Surface Science. Volume 293. 2014. Pages 312-317.

7. ANEXO

Roteiro da prática de biocatálise elaborado a partir dos estudos realizados nesta monografia pelo aluno Pedro Nascimento Casimiro.

A prática consistiu na redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão comercial Biox (levedura: *Saccharomyces cerevisiae*).

REDUÇÃO DE ACETOFENONA E DA *p*-CLORO-ACETOFENONA COM BORO-HIDRETO DE SÓDIO PARA A OBTENÇÃO DA MISTURA RACÊMICA DO (±)-1-FENIL-ETANOL E DO (±)-*p*-CLORO-1-FENIL-ETANOL, RESPECTIVAMENTE

Manhã

Assuntos abordados: Reação de redução, transformação de grupos funcionais, mecanismo de reação, estereoquímica, caracterização (RMN, separação quiral).

Docente: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

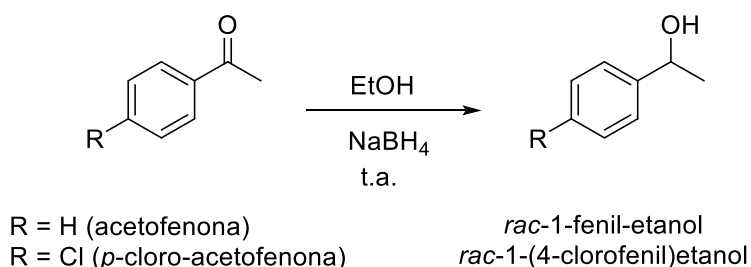
Técnicos: Altair Aparecido e Reinaldo Hamaguchi

Colaboradores: Pedro Nascimento (aluno de monografia – IQSC) e Prof. Dr. David Esteban Quintero Jimenez (UFAP)

OBJETIVO

Realizar a redução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com boro-hidreto de sódio para a obtenção da mistura racêmica do (±)-1-fenil-etanol e do (±)-*p*-cloro-1-fenil-etanol, respectivamente (Esquema 1).

Esquema 1. Síntese do (±)-1-fenil-etanol e do (±)-*p*-cloro-1-fenil-etanol via redução com NaBH₄ da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona, respectivamente.



CONCEITOS

Boro-hidreto de sódio (NaBH₄) é um agente redutor efetivo e seletivo para a redução de grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas. As reações ocorrem em condições brandas, inclusive em alguns casos, na presença de água, o que não é possível com o uso de outros redutores (Ex. hidreto de lítio e alumínio, LiAlH₄). O NaBH₄ não reduz ácidos carboxílicos, ésteres e amidas. O uso de boro-hidreto de sódio é viável uma vez que tal reagente é de fácil manipulação, menos tóxico, de baixo custo e não requer condições inertes.

MATERIAIS E REAGENTES/SOLVENTES

Reagentes e solventes: acetofenona (200 mg), *p*-cloroacetofenona (200 mg), ácido clorídrico 1M (gotas, HCl), boro-hidreto de sódio (80 mg), etanol 95% (15 mL), éter dietílico (3x de 20 mL), sulfato de sódio anidro (1 espátula), hexano e acetato de etila (AcOEt).

Materiais: Balão de 125 mL, espátulas, funil de extração, funil de filtração simples, papel de filtro, placa de agitação, pulga ou peixinho, placa de CCD, pipeta Pasteur, algodão, placas de CCD.

NOTA 1: No relatório demonstrar o cálculo de estequiometria da reação a partir de 200 mg de cetona.

NOTA 2: Lembre-se que os **4 hidretos** do NaBH_4 participam da reação de redução.

EQUIPAMENTO: Câmara de UV-vis, RMN, IV, EM e CG-quiral.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- 1) Em um balão de 125 mL pese a acetofenona (200 mg) ou a *p*-cloro-acetofenona (200 mg).
 - 2) Em seguida adicione o etanol 95% (15 mL) e agite com uma barra magnética.
 - 3) Adicione lentamente o NaBH_4 .
 - 4) Deixe a reação em agitação por 20 minutos.
 - 5) Acompanhe a reação por cromatografia em camada delgada após os 20 minutos.
- Nota 1: Aplicar na placa CCD a cetona (material de partida) e a reação. Eluir em hexano e AcOEt (80:20), revelar em UV-vis.
- Nota 2: Se houver necessidade adicione um pequeno excesso de NaBH_4 . Deixe por mais 20 minutos e acompanhe por CCD.
- 6) Faça a extração da reação por partição em funil de extração com o éter dietílico (3 x 20 mL).
 - 7) Combine as fases orgânicas e adicione o sulfato de sódio anidro em quantidade suficiente.
 - 8) Filtre a fase orgânica em funil com algodão para retirar o sulfato de sódio.
 - 9) Concentre a fase orgânica em rotaevaporador.
 - 10) Transfira o produto do balão para um frasco de penicilina e determine o rendimento.
 - 11) Caracterize o produto (RMN, IV, EM, CG-FID via separação quiral).

PERGUNTAS

- 1) Descreva o mecanismo da reação de redução com o boro-hidreto de sódio.
- 2) Descreva os possíveis produtos quando é empregado o boro-hidreto de sódio em compostos como: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$.
- 3) Por que a reação de redução com boro-hidreto de sódio utilizou um solvente prótico.
- 4) Por que a redução com boro-hidreto de sódio formou um álcool racêmico? Explique.

Artigo recomendado para leitura

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000042

OBs. Os autores disponibilizam esta prática àqueles que desejarem utilizar na aula de ensino.

Agradecimento: Um agradecimento especial ao aluno de graduação **Pedro Nascimento Casimiro**, quem realizou durante a sua monografia este experimento para ser aplicado na aula de Laboratório de Química Orgânica.

PRÁTICA DE BIOCATÁLISE

BIORREDUÇÃO DE ACETOFENONA E DA *p*-CLORO-ACETOFENONA COM FERMENTO DE PÃO BIOX (*Saccharomyces cerevisiae*) PARA A OBTENÇÃO DO (+)-(*R*)-1-FENIL-ETANOL E DO (*S*^{*})-*p*-CLORO-1-FENILETANOL, RESPECTIVAMENTE

TARDE

Assuntos abordados: Reação de biorredução, transformação de grupos funcionais, mecanismo de reação, estereoquímica, excesso enantiomérico, configuração absoluta, separação quiral e rotação óptica.

Docente: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

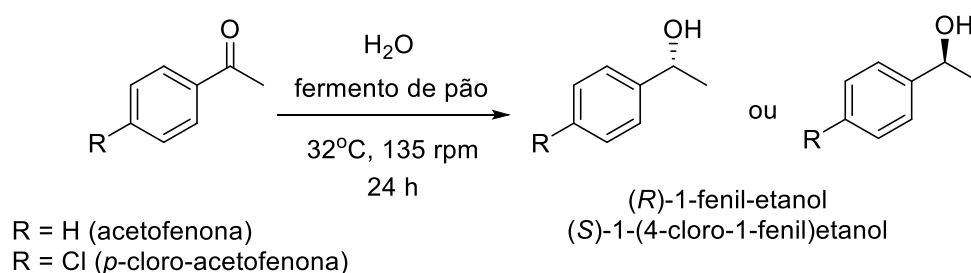
Técnicos: Altair Aparecido e Reinaldo Hamaguchi

Colaboradores: Pedro Nascimento (aluno de monografia – IQSC) e Prof. Dr. David Esteban Quintero Jimenez (UFAP)

OBJETIVO

Realizar a biorredução da acetofenona e da *p*-cloro-acetofenona com fermento de pão Biox (*S. cerevisiae*) para a obtenção do (+)-(*R*)-1-fenil-etanol e (*S*^{*})-*p*-cloro-1-fenil-etanol, respectivamente, enantiomericamente puros ou enriquecidos (Esquema 1).

Esquema 1. Síntese do 1-fenil-etanol e do *p*-(cloro-1-fenil)etanol via redução com fermento de pão (*S. cerevisiae*).



CONCEITOS

O fermento de pão (levedura) contém as enzimas redutases (álcool desidrogenases) e os cofatores (NADH, NADPH) que promovem a redução estereosseletiva de grupos carbonílicos de cetonas pró-estereogênicas. As reações ocorrem em condições brandas (pH neutro, temperatura ambiente) e na presença de água como solvente. A vantagem da reação biocatalítica de redução de cetonas pró-quirais com microrganismos é que leva geralmente a formação de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, pois é catalisada por enzimas e seus cofatores. As enzimas são catalisadores quirais, por isso comumente realizam transformações assimétricas. Todo o processo de biorredução com fermento de pão é ambientalmente sustentável, pois usa água como solvente e o catalisador é biodegradável e proveniente de fonte renovável (levedura).

MATERIAIS E REAGENTES/SOLVENTES

Reagentes: acetofenona (0,1 mL e 0,2 mL), *p*-cloro-acetofenona (0,1 mL e 0,2 mL), éter dietílico (60 mL), sulfato de sódio anidrido, hexano e acetato de etila (AcOEt), fermento biológico comercial *in natura*.

Materiais: Frascos erlenmeyer de 250 mL, espátulas, funil de extração, funil de filtração simples, papel de filtro, algodão, placa de agitação, pulga ou peixinho, placa de CCD, pipeta Pasteur, tubo de centrifuga.

EQUIPAMENTOS: Shaker, Centrífuga Refrigeradora, Câmara de UV-vis, CG-quiral, Polarímetro.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1) Em um frasco erlenmeyer de 250 mL pese 25 g de fermento de pão *in natura*.

NOTA: O fermento de pão Biox foi adquirido em comércio local (padaria).

2) Adicione ao frasco erlenmeyer 100 mL de água destilada e misture bem a água e o fermento.

3) Em cada frasco Erlenmeyer, separadamente, adicione 100 µL e 200 µL das cetonas (acetofenona e *p*-cloro-acetofenona).

4) Em seguida leve os frascos erlenmeyer para o shaker (agitador circular) e deixe em agitação por 24 h, 32 °C, 135 rpm.

NOTA: A reação pode ser feita também em placa magnética à temperatura ambiente.

5) Após as 24 h, retire os frascos do agitador circular (ou da placa magnética) e transfira o conteúdo para tubos de centrifuga.

6) Centrifugar a 10.000 rpm, 5 minutos, 20 °C.

7) Transfira o sobrenadante para um funil de separação e faça a extração com AcOEt ou Et₂O (3x 20 mL).

8) Combine as fases orgânicas e adicione o sulfato de sódio anidro.

9) Filtre a fase orgânica em funil com algodão para retirar o sulfato de sódio.

10) Concentre a fase orgânica em rotaevaporador.

11) Transfira o produto do balão para um frasco de penicilina e determine o rendimento.

12) Determine o excesso enantiomérico em coluna quiral (β-ciclodextrina).

13) Determine o valor da rotação ótica em um polarímetro.

PERGUNTAS

1) Descreva o mecanismo da reação de redução com fermento de pão.

2) Qual o papel do cofator NADH.

3) Que é uma cetona pró-quiral ou pró-estereogênica?

4) Como determinar o excesso enantiomérico?

5) Como determinar a configuração absoluta dos produtos?

OBs. Os autores disponibilizam esta prática àqueles que desejarem utilizar na aula de ensino.

Agradecimento: Um agradecimento especial ao aluno de graduação **Pedro Nascimento Casimiro**, quem realizou durante a sua monografia este experimento para ser aplicado na aula de Laboratório de Química Orgânica.