



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico mediada pelo sistema
TEMPO–lacase de *Trametes versicolor***

KAREN PETYELE LORENO

CAXIAS DO SUL

2025

KAREN PETYELE LORENO

**Síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico mediada pelo sistema
TEMPO–lacase de *Trametes versicolor***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando o cumprimento dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva.

CAXIAS DO SUL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L868s Loreno, Karen Petyele

Síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico mediada pelo sistema TEMPO-lacase de *Trametes versicolor* [recurso eletrônico] / Karen Petyele Loreno. – 2025.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

Orientação: Thiago Barcellos da Silva.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Oxidação. 2. Álcool. 3. Biocatálise. 4. Lacase. 5. Glicerol. 6. Compostos químicos. I. Silva, Thiago Barcellos da, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 678.094.3

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

**Síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico mediada pelo sistema
TEMPO–lacase de *Trametes versicolor***

KAREN PETYELE LORENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando o cumprimento dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, sob orientação do Professor Dr. Thiago Barcellos da Silva.

O presente trabalho foi avaliado e aprovado, em 4 de julho de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva
Universidade de Caxias do Sul – UCS
(Presidente da banca)

Prof. Dr. Eduardo Eliezer Alberto
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof^ª. Dr^ª. Marli Camassola
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Bulegon Brondani
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui.

Agradeço à Universidade de Caxias do Sul (UCS), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIO), por viabilizarem esta pesquisa, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de auxílio para custeio de taxas escolares (CAPES/PROSUC - Modalidade II).

Ao meu orientador, professor Thiago, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LBIOP) da Universidade de Caxias do Sul, agradeço especialmente ao mestre Vinicius B. Molon, por ter me acolhido desde o início e me auxiliado em todas as etapas do trabalho; à pós-doutora Laura Abenante, cuja contribuição foi essencial para os testes de síntese química; e às bolsistas de iniciação científica Manuela Onzi, Karen Duda e, em especial, Taís De Col, que me apoiaram na reta final, em um momento tão especial e abençoado da minha vida, que é a maternidade. A todos, registro minha sincera gratidão pelo apoio e pela colaboração na realização deste trabalho.

Por fim, agradecer à minha família, em especial meu esposo Jonatan F. Braga de Lima e meus pais, José D. Loreno e Sonia T. da Rosa Melo pelo amor, paciência, carinho e incentivo. AMO vocês!

RESUMO

A oxidação de álcoois para a obtenção de produtos de maior valor agregado é um processo já consolidado na indústria. Nesse contexto, a oxidação do glicerol para a obtenção de glicerol carbonato torna-se uma estratégia particularmente interessante, pois utiliza um subproduto industrial para gerar uma molécula simples, porém versátil, com aplicações em diferentes processos voltados à produção de compostos refinados. O glicerol carbonato apresenta características favoráveis, como atoxicidade, biodegradabilidade e solubilidade em água, o que o torna um produto promissor. Essas propriedades justificam seu crescente destaque na literatura científica e técnica, tanto como intermediário em aplicações na sua forma original quanto como substrato para transformações químicas com o objetivo de funcionalização, ampliando ainda mais seu potencial de uso. Tendo em vista isso, o estudo de otimização de um processo biocatalítico para a conversão do glicerol carbonato para o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico, composto que pode ser utilizado na produção de polímeros livres de isocianatos, produtos farmacêuticos, aminas, entre outros. A oxidação do grupo funcional álcool do glicerol carbonato ao correspondente ácido carboxílico foi promovida por meio de um sistema oxidativo lacase-mediador, composto pela enzima lacase proveniente do fungo *Trametes versicolor* e pelo mediador redox TEMPO (radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila). No estudo, foram avaliados os efeitos de diferentes parâmetros reacionais, como a composição e o pH da solução tampão, temperatura, tempo de reação, necessidade de oxigênio, redução no uso de reagentes e purificação da síntese enzimática. O sistema biocatalítico proposto mostrou-se altamente eficiente, resultando em uma conversão do glicerol carbonato superior a 99% em ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico. Dessa forma, este trabalho propõe uma rota biocatalítica promissora para a produção desse composto, reforçando a viabilidade de processos enzimáticos sustentáveis na valorização de subprodutos industriais.

Palavras-chave: álcool; biocatálise; glicerol carbonato; lacase; oxidação.

ABSTRACT

The oxidation of alcohols to obtain higher-value products is a well-established industrial process. In this context, oxidizing glycerol to produce glycerol carbonate is an interesting strategy because it uses an industrial byproduct to create a simple but versatile molecule with applications in processes that produce refined compounds. Glycerol carbonate is a promising product due to its favorable characteristics, such as non-toxicity, biodegradability, and solubility in water. These properties explain why it is becoming more prominent in scientific and technical literature. It is used as an intermediate in applications in its original form and as a substrate for chemical transformations to functionalize it, which expands its potential use. Given this, this study focuses on optimizing the biocatalytic conversion of glycerol carbonate into 2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxylic acid. This compound can be used to produce isocyanate-free polymers, pharmaceutical products, and amines, among other products. The oxidation of the alcohol functional group of glycerol carbonate to the corresponding carboxylic acid was promoted by a laccase-mediator oxidative system, composed of the laccase enzyme from *Trametes versicolor* and the redox mediator TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidyl-1-oxyl radical). The reaction parameters, including buffer composition and pH, reaction temperature, reaction time, oxygen requirement, reduction in the amount of reagents, and product purification protocols, were evaluated. The proposed biocatalytic system demonstrated high efficiency, converting 99% of glycerol carbonate to 2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxylic acid. Thus, this work proposes a promising biocatalytic route for producing 2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxylic acid, which reinforces the viability of sustainable enzymatic processes for valorizing industrial by-products.

Keywords: alcohol; biocatalysis; glycerol carbonate; laccase; oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da reação de álcool com reagente de Jones.	15
Figura 2. Esquema da reação de álcool com o reagente PCC.	16
Figura 3. Esquema da reação de álcool com reagente PDC.	16
Figura 4. Esquema da reação de álcool com dióxido de manganês	17
Figura 5. Esquema da reação de álcool com reagente TEMPO	18
Figura 6. Fotografia do caule da árvore de laca chinesa (<i>Rhus vernicifera</i>), mostrando a seiva escorecida pela ação das lacases.	20
Figura 7. Representação simplificada do mecanismo de oxidação da hidroquinona por uma lacase com a conversão do oxigênio em água.....	21
Figura 8. Modelo molecular tridimensional da estrutura cristalina da lacase de <i>T. versicolor</i> , gerada a partir do modelo 1GYC (https://www.rcsb.org/structure/1gyc) e enfoque no modelo molecular do sítio catalítico com a disposição dos cobres do tipo T1, T2 e T3.	22
Figura 9. Esquema simplificado dos ciclos quimio-biocatalíticos do sistema lacase – mediador redox.....	23
Figura 10. Moléculas naturais (A) e não naturais (B) frequentemente empregadas como mediadores redox nos sistemas oxidativos lacase – mediador.	24
Figura 11. Mecanismo quimio-biocatalítico de oxidação de álcoois primários pelo sistema lacase – TEMPO.	24
Figura 12. Oxidação de aldeídos aos correspondentes álcoois.....	25
Figura 13. Esquema da oxidação do 5-hidroximetilfurfural para obtenção do 2,5-furanodicarboxílico.....	27
Figura 14. Rotas para obtenção do glicerol carbonato a partir do glicerol.....	29
Figura 15. Reação de transesterificação do glicerol com dimetilcarbonato promovida por base para a obtenção do glicerol carbonato.....	30
Figura 16. Síntese química do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico empregando permanganato de potássio.	32

Figura 17. Síntese química do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico empregando o sistema oxidante TEMPO - TCCA.	33
Figura 18. Síntese de glicerol carbonato a partir do glicerol e dimetil carbonato.	40
Figura 19. Equação química para a síntese do padrão do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.	41
Figura 20. (A) espectro de massas da reação de síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico e (B) comparação entre o pico registrado para (acima) o espectro simulado (abaixo) para a fórmula elementar $C_4H_3O_5 [M-H]^-$	42
Figura 21. Cromatograma obtido da análise do produto da reação de síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico e cromatograma do glicerol carbonato.	43
Figura 22. (A) sobreposição dos cromatogramas registrados para as dez concentrações de glicerol carbonato e (B) curva analítica gerada a partir das concentrações analisadas e relacionadas a área correspondente aos picos cromatográficos.	44
Figura 23. Gráfico da relação entre resíduo em função da concentração de glicerol carbonato obtidos pela curva de calibração.	45
Figura 24. (A) equação química para a reação de oxidação da siringaldazina pela lacase de <i>T. versicolor</i> com a formação do produto tetrametoxi-azo-bismetilenoquinona e, (B) gráfico resultante da absorbância em 530 nm função do tempo.	47
Figura 25. (A) equação química para a reação de conversão do glicerol ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico com as condições estipuladas para avaliação do feito da solução tampão e, (b) sistema utilizado para o estudo das reações enzimáticas. No detalhe é mostrado os vials com as reações de oxidação biocatalisadas após 24 h.	49
Figura 26. Efeito da natureza da solução tampão na conversão de glicerol carbonato.	50
Figura 27. Cromatograma resultante da análise da reação de oxidação quimio-enzimática do glicerol carbonato em solução tampão acetato de sódio (pH 4,5, 100 mmol L ⁻¹). ..	51
Figura 28. Cromatograma resultante da análise da reação de oxidação quimio-enzimática do glicerol carbonato em solução tampão citrato de sódio (pH 4,5, 100 mmol L ⁻¹).	52
Figura 29. Avaliação do efeito do pH (B) e da concentração (C) do tampão acetato na conversão do glicerol carbonado ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.	53

Figura 30. Efeito do pH do meio reacional constituído de tampão citrato de sódio na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico em tampão citrato de sódio.	56
Figura 31. Cromatograma resultante da análise da reação de oxidação quimio-enzimática do glicerol carbonato em solução tampão citrato de sódio (pH 5,0, 100 mmol L ⁻¹).	56
Figura 32. Efeito da concentração da solução tampão citrato de sódio na conversão do glicerol carbonato.....	57
Figura 33. Efeito da temperatura e do tempo na conversão do glicerol carbonato no ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.	58
Figura 34. Esquema reacional representado a reação quimio-enzimática de oxidação do glicerol carbonato na ausência de uma atmosfera enriquecida de oxigênio.	59
Figura 35. (A) Sistema reacional utilizado para o escalonamento da reação enzimática e (B) cromatograma da análise de uma alíquota da reação após 24 h.....	61
Figura 36. Cromatograma do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico após o processo de purificação.....	63
Figura 37. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, D ₂ O) do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	64
Figura 38. Espectro de RMN de ¹³ C (75,4 MHz, D ₂ O) do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	65
Figura 39. Espectro de RMN de ¹³ C {H}-APT (75,4 MHz, D ₂ O) do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos na determinação da linearidade do método de quantificação de glicerol carbonato	45
Tabela 2. Dados para obtenção do limite de quantificação e detecção de glicerol carbonato ..	46
Tabela 3. Efeitos do tempo reacional e das quantidades de lacase e TEMPO na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	55
Tabela 4. Efeito da quantidade de lacase e TEMPO na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.	60

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

5-HMF	5-hidroximetilfurfural
AODC	Ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMC	Dimetilcarbonato
EMAR	Espectrofotômetro de massas de alta resolução
FDCA	Ácido furanodicarboxílico
GC	Glicerol carbonato
LD	Limite de detecção
SLM	Sistema lacase – mediador redox
LQ	Limite de quantificação
RMN de ^{13}C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ^1H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TEMPO	Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Oxidação de álcoois para obtenção de produtos para uso na indústria	15
3.2. Enzimas como biocatalisadores: avanços históricos e aplicações na indústria ...	18
3.3. Aplicação de enzimas lacases na oxidação de álcoois	19
3.4. Obtenção e aplicação do glicerol carbonato	28
3.5. Síntese e aplicações do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Materiais.....	34
4.1.1. Reagentes, solventes e outros materiais	34
4.2. Métodos.....	34
4.2.1. Instrumentação analítica.....	34
4.2.2. Síntese do glicerol carbonato	34
4.2.3. Síntese química para obtenção do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico	35
4.2.4. Preparo das soluções tampão para síntese enzimática	36
4.2.5. Medida da atividade enzimática da lacase comercial de <i>Trametes versicolor</i>	36
4.2.6. Procedimentos experimentais de otimização para a síntese biocatalisada do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico	37
4.2.7. Determinação da conversão do glicerol carbonato por cromatografia líquida de alta eficiência.....	38
4.2.8. Escalonamento da síntese biocatalisada do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Síntese do substrato glicerol carbonato a partir de glicerol	40
5.2. Síntese do padrão do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico	40
5.3. Estudo de linearidade para curva analítica na avaliação da conversão de glicerol carbonato por cromatografia líquida de alta eficiência	43

5.3.1. Estudo de limite de quantificação (LQ) e detecção (LD) para a técnica por HPLC	46
5.4. Avaliação da atividade enzimática da lacase comercial de <i>T. versicolor</i>	47
5.5. Estudos de otimização das condições reacionais para a conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico	48
5.5.1. Efeito da natureza da solução tampão na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	48
5.5.2. Efeito do pH e da concentração da solução tampão acetato na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	53
5.5.3. Efeito da concentração de mediador redox e da lacase na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.	54
5.5.4. Efeito do pH e da concentração da solução tampão citrato na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	55
5.5.5. Efeito de temperatura na conversão de glicerol carbonato ao longo do período de 24 h.....	57
5.5.6. Efeito da atmosfera enriquecida de oxigênio na conversão do glicerol carbonato	59
5.5.7. Efeito da redução de TEMPO e lacase na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	60
5.6. Escalonamento da síntese e purificação do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico	61
5.7. Caracterização estrutural do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.....	63
6. CONCLUSÃO	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

As reações de oxidação desempenham um papel fundamental na química orgânica sintética, sendo amplamente empregadas na indústria para a produção de compostos nas mais diferentes áreas de aplicação. A oxidação de álcoois primários e secundários destaca-se pela sua utilidade em obter aldeídos e ácidos carboxílicos, no caso de serem utilizados álcoois primários como substratos, ou cetonas, quando são empregados álcoois secundários, e assim preparar compostos intermediários ou produtos finais contendo estes grupos funcionais. No entanto, os processos oxidativos tradicionais apresentam impactos ambientais e riscos à saúde humana, principalmente por utilizarem reagentes que contêm elementos como cromo e o manganês. Os resíduos gerados a partir dos processos clássicos de oxidação demandam tratamentos complexos antes do descarte, além de exigir cuidados no manuseio para garantir a segurança das pessoas envolvidas.

Visando minimizar esses problemas, a busca por metodologias verdes de oxidação tem ganhado destaque. Essas abordagens podem envolver o uso de oxigênio molecular, metais nobres e, especialmente, a biocatálise, que emprega enzimas capazes de promover reações sob condições brandas, como temperatura ambiente e pressão atmosférica. Embora já bem estabelecida no âmbito da pesquisa acadêmica, a biocatálise vem ampliando espaço na indústria e assim se consolidando como uma alternativa promissora por oferecer processos mais limpos e sustentáveis.

Dentre as diferentes enzimas pertencentes à classe das oxidorredutases, as lacases são enzimas que naturalmente promovem a oxidação de compostos fenólicos. Porém, outras classes de compostos podem ser empregadas como substratos quando houver presente no sistema um mediador redox, formando assim o sistema lacase-mediador redox.

Por outro lado, considerando a crescente preocupação com o desenvolvimento de processos industriais sustentáveis, o aproveitamento de subprodutos gerados em outros processos produtivos constitui uma estratégia chave para a sustentabilidade. Nesse contexto, o glicerol destaca-se como uma fonte promissora de carbono derivado de biomassa, o que devido às suas características estruturais é possível uma variabilidade de transformações químicas e bioquímicas, permitindo a obtenção de moléculas de maior valor agregado. Um derivado relevante do glicerol é o glicerol carbonato, que tem sido utilizado como agente umectante em cosméticos, precursor na síntese de poliuretanos

verdes e como intermediário na produção de compostos finos, como ésteres, além de sua aplicação em formulações de vernizes e tintas.

O glicerol carbonato é uma molécula estruturalmente simples, mas que apresenta grande potencial para modificações químicas, permitindo a obtenção de estruturas mais complexas e funcionalizadas, ampliando seu campo de aplicação em diferentes setores industriais.

Neste sentido, os produtos de oxidação do glicerol carbonato, seja o aldeído ou o ácido carboxílico correspondente, possuem escassos relatos na literatura científica, sendo que o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico possui principalmente relatos em documentos de patentes, em que é descrito como intermediário na produção de hidroxiuretanos e como grupo terminal para o bloqueio de aminas. Estes documentos relatam de forma pouco clara a metodologia de síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico, e não há descrição de dados sobre pureza, rendimentos, e nem mesmo dados para as caracterizações estruturais ou físico-químicas. Desta forma, este estudo explora o emprego de um sistema oxidativo lacase-mediador redox como uma estratégia biotecnológica para a produção do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico a partir do glicerol carbonato.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Preparar o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico a partir da oxidação quimio-enzimática do glicerol carbonato empregando um sistema lacase-TEMPO para aplicação industrial.

2.2. Objetivos específicos

- a) Sintetizar o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico a partir da oxidação do glicerol carbonato por meio do sistema lacase-mediador redox, constituído pela lacase comercial de *Trametes versicolor* e o mediador redox TEMPO;
- b) investigar o efeito das condições reacionais, solução tampão, pH, temperatura e tempo na conversão, seletividade e rendimento;
- c) recuperar do meio reacional o produto ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico com elevada pureza;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção, será apresentado o estado da arte relacionado à oxidação de álcoois a ácidos carboxílicos, com ênfase nos processos biocatalíticos mediados por enzimas do tipo lacase, bem como suas aplicações em metodologias alternativas voltadas à síntese de produtos de alto valor agregado. Serão também discutidos os avanços nos estudos envolvendo reações com glicerol carbonato, destacando seu uso para obtenção de outras moléculas de interesse industrial, com potencial aplicação em diversos setores.

3.1. Oxidação de álcoois para obtenção de produtos para uso na indústria

A reação de oxidação de álcoois ocupa um papel relevante na indústria química, especialmente em setores como o farmacêutico e de especialidades químicas. A oxidação de álcoois primários pode resultar na formação de aldeídos ou de ácidos carboxílicos, sendo esse resultado dependente do agente oxidante empregado e das condições reacionais. Por sua vez, álcoois secundários, quando submetidos a processos de oxidação, são convertidos em cetonas. Já os álcoois terciários não sofrem oxidação, uma vez que não possuem hidrogênio ligado ao carbono que sustenta o grupo hidroxila, o que impede a quebra da ligação C-H necessária para a formação de produtos oxidados (Zorzanelli e Muri, 2015).

Dentre os métodos clássicos de oxidação, destacam-se aqueles que utilizam compostos à base de cromo, conhecidos por sua elevada eficiência como agentes oxidantes. O trióxido de cromo (CrO_3), na presença de ácido sulfúrico diluído em acetona, dá origem ao ácido crômico, formando o chamado reagente de Jones (Figura 1).

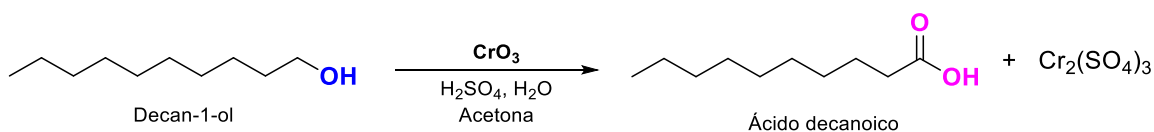


Figura 1. Esquema da reação de álcool com reagente de Jones.

Este reagente é amplamente empregado devido ao seu baixo custo e alta eficácia na oxidação de álcoois. Na presença desse sistema, por exemplo, álcoois primários são convertidos diretamente em ácidos carboxílicos (Zorzanelli e Muri, 2015).

Além disso, o trióxido de cromo é usado na síntese de outros reagentes cromados, como o clorocromato de piridínio (PCC) e o dicromato de piridínio (PDC), ambos

largamente utilizados em processos de oxidação seletiva. O PCC atua de forma eficiente em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) na oxidação de álcoois, conforme Figura 2.

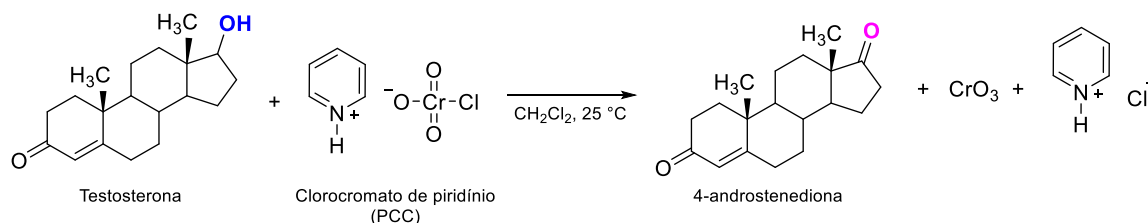


Figura 2. Esquema da reação de álcool com o reagente PCC.

Já o PDC é obtido pela reação de trióxido de cromo com piridina em meio aquoso a cerca de 30 °C. Quando empregado em meio orgânico, como diclorometano, o PDC promove a oxidação Figura 3, oferecendo uma alternativa eficiente e seletiva aos métodos tradicionais (Zorzanelli e Muri, 2015).

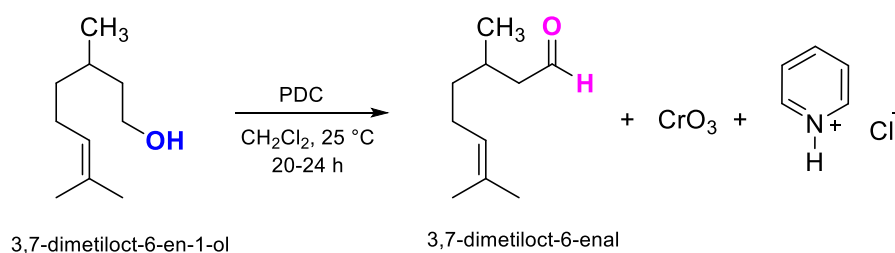


Figura 3. Esquema da reação de álcool com reagente PDC.

Outro grupo de agentes oxidantes amplamente utilizado em processos de oxidação orgânica são compostos derivados de manganês, como o permanganato de potássio (KMnO_4) e o dióxido de manganês (MnO_2) (Figura 4). Embora esses reagentes apresentem eficiência na oxidação de álcoois, seu uso também acarreta a geração de resíduos contendo manganês. Adicionalmente, destaca-se o dimetilsulfóxido como agente oxidante, que, em presença de cloreto de oxalila a temperaturas baixas (-78 °C) produz o íon sulfônio. Este, reage com álcoois, promovendo sua oxidação e levando à formação de aldeídos ou cetonas (Zorzanelli e Muri, 2015).

Verde, visando por exemplo, a redução na geração de resíduos, e o uso de reagentes atóxicos (Hirano; Miyamoto; Ohta, 2008).

Tais princípios têm origem nos fundamentos estabelecidos por Paul Anastas e John C. Warner, que, em 1998, publicaram a obra *Green Chemistry: Theory and Practice*, na qual propuseram diretrizes essenciais para orientar a prática da química no sentido de reduzir os impactos ambientais (Anastas; Warner, 1998). Esses princípios servem como base para o desenvolvimento de processos e produtos mais seguros, eficientes e sustentáveis, alinhando a atividade química às demandas de preservação ambiental e proteção da saúde humana (Sheldon, 2024).

Dentre os métodos considerados verdes para a oxidação de álcoois, temos aquelas com o uso do radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila, comumente representado pela sigla TEMPO. Nesse sistema, o agente ativo responsável pela oxidação do álcool é o cátion oxoamônio, gerado a partir do TEMPO (Figura 5). Este cátion apresenta a capacidade de ser regenerado por meio da ação de outros agentes oxidantes presentes no meio reacional, como o clorito de sódio (NaClO_2) ou o ácido tricloroisocianúrico (TCCA). Dessa forma, o TEMPO atua de maneira catalítica no processo, sendo continuamente reciclado ao longo da reação, o que contribui para a redução do consumo de reagentes e da geração de resíduos, alinhando-se aos princípios da Química Verde (Zorzanelli e Muri, 2015).

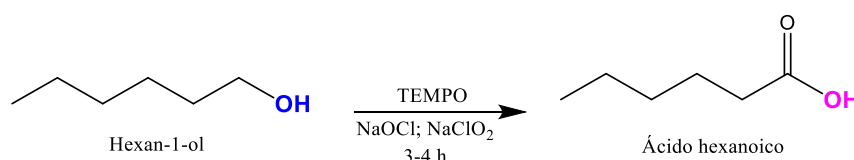


Figura 5. Esquema da reação de álcool com reagente TEMPO

3.2. Enzimas como biocatalisadores: avanços históricos e aplicações na indústria

As enzimas são macromoléculas vitais para a manutenção da vida atuando como catalisadores biológicos (biocatalisadores) e assim promovendo inúmeras reações bioquímicas. Ainda que os processos biotecnológicos que utilizam enzimas sejam utilizados há muitos anos, como por exemplo a produção de alimentos e bebidas por meio da fermentação, foi em 1833 que foi descrita a primeira enzima, na época denominada diástase, e que hoje sabe-se se tratava de uma amilase. Mais tarde, em 1903, Henry Drysdale Dakin isolou um extrato enzimático do fígado de porco e demonstrou que as

enzimas presentes nesse extrato eram capazes de atuar mesmo fora de um organismo vivo, hidrolisando moléculas de ésteres em ácidos graxos e álcool. Esse trabalho foi um avanço na bioquímica porque mostrou que as enzimas não só eram específicas em suas reações, mas também podiam ser utilizadas para fins sintéticos (Dakin, 1903).

Anos depois, em 1913, Otto Rohm utilizou a enzima comercial, tripsina, do pâncreas animal para uso como detergente (Al-Ghanayem e Joseph, 2020). Outro marco importante na história das enzimas ocorreu em 1936, quando Ernest Alexander Sym relatou um experimento sobre a reação de esterificação de ácidos carboxílicos utilizando esterases extraídas do pâncreas suíno. Ele observou que essas enzimas não eram inativadas na presença de solventes como acetona, benzeno e tetracloreto de carbono, demonstrando resistência, versatilidade e um rendimento superior em comparação aos sistemas aquosos (Sym, 1936). Na década de 1960, proteases e amilases começaram a ser introduzidas como aditivos em detergentes para remoção de manchas de proteínas. Desde então as enzimas vêm sendo estudadas e aprimoradas para os mais diversos setores da indústria, como na engenharia genética, medicina, farmacêutica, combustíveis, etc. (Al-Ghanayem e Joseph, 2020).

Um exemplo mais recente de aplicação comercial da biocatálise foi a substituição de rota química para a produção de ésteres emolientes (substâncias com propriedades de amaciar/suavizar a pele), técnica desenvolvida pela multinacional sediada na Alemanha Evonik, especialista em produtos químicos finos. A produção passou a ser realizada com enzima lipase CAL-B que inicialmente apresentava um custo elevado se comparado com o processo convencional, porém o processo químico era realizado em temperatura superior a 180 °C o que ocasionava a formação de diversos subprodutos com características desagradáveis para o mercado, exigindo gastos com purificação para remoção de odor e cor. Com o processo catalisado por lipase, o produto é obtido a temperaturas mais baixas, entre 60 °C e 80 °C, sem a formação de resíduos, o que o torna mais vantajoso (Wu et al., 2021).

3.3. Aplicação de enzimas lacases na oxidação de álcoois

As enzimas lacases fazem parte da classe das oxidoredutases (EC 1.10.3.2), e são definidas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como benzenodiol: oxigênio oxidoredutases e estão presentes em vários

organismos como plantas, fungos e bactérias. Embora a classificação EC (*Enzyme Commission*) define que o substrato padrão é o benzenodiol, estas enzimas atuam na oxidação de diversos compostos fenólicos e não fenólicos (IUBMB, 2025).

A primeira descrição de uma lacase ocorreu em 1883, no Japão, pelo pesquisador Hikorokuro Yoshida (Yoshida, 1883), ao analisar a composição da seiva da árvore de laca chinesa (*Toxicodendron vernicifluum*, que na época era descrita como *Rhus vernicifera*). Mais tarde, entre 1894 e 1896, o pesquisador francês Gabriel Bertrand aprofundou os estudos sobre as lacases, definindo melhor sua classificação como oxidase. Em seu estudo, ele relatou que a seiva, inicialmente incolor ou levemente amarelada da árvore japonesa, se tornava escura (Figura 6) não apenas devido à exposição ao ar, mas também pela ação de uma diástase, que chamou de lacase. Neste experimento, também observou que a seiva não se alterava quando mantido em frascos fechados por tempos prolongados, no entanto, quando em contato com o ar, se oxidava rapidamente formando um filme de cor preta e intensa, insolúvel em solventes, explicando sua alta demanda no extremo oriente como verniz brilhante de alta resistência. (Wisniak, 2014).



Figura 6. Fotografia do caule da árvore de laca chinesa (*Rhus vernicifera*), mostrando a seiva escurecida pela ação das lacases.

Além de serem observadas nas seivas, as lacases já foram relatadas na oxidação de diversos substratos como aminas aromáticas e alifáticas, aldeídos e álcoois. Devido às suas condições brandas de trabalho em relação à temperatura e ao pH, as lacases podem ser aplicadas em diversos setores, como as indústrias alimentícia e têxtil, nas quais são aplicadas na redução de oxigênio para produção de cerveja aumentando a validade do

produto e no branqueamento de fibras, respectivamente (Marino et al., 2022). Bassanini *et al.* (2021) também destaca o importante papel das lacases na indústria de polpa de celulose, especificamente na deslignificação de fibras lenhosas. A ampla aplicabilidade das lacases as torna uma ferramenta sustentável e "verde" para diversos processos industriais.

As lacases são enzimas glicoproteicas e monoméricas, com massas molares que podem variar de 50 a 130 kDa, em que a porção formada de carboidratos tem a função de contribuir para a estabilidade destas enzimas (LI *et al.*, 2024). Estas enzimas fazem parte do grupo de enzimas conhecidas como azul multicobre oxidases, por serem enzimas que oxidam os substratos pela transferência de um único elétron. O estado de oxidação da lacase é restaurado com a participação de oxigênio molecular como aceitor final de elétrons, produzindo somente água como subproduto da reação. Assim, o ciclo catalítico (Figura 7) é finalizado com a redução de uma molécula de oxigênio produzindo duas moléculas de água, bem como a oxidação de quatro moléculas do substrato, resultando em quatro radicais.

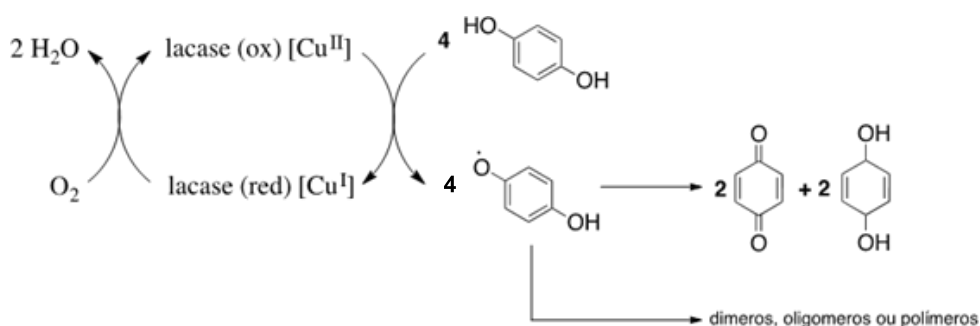


Figura 7. Representação simplificada do mecanismo de oxidação da hidroquinona por uma lacase com a conversão do oxigênio em água.

A estrutura cristalina completa da lacase de *T. versicolor*, contendo todos os cobres, cadeia polipeptídica e sete porções de carboidratos foi apresentada por Piontek e colaboradores (2002), do Instituto de Bioquímica da Suíça, e depositada no banco de dados de proteínas e codificada como 1GYC (10.2210/pdb1GYC/pdb). A partir da estrutura cristalina pode-se estipular o mecanismo enzimático por trás da oxidação.

A Figura 8 demonstra o modelo molecular gerado a partir da estrutura cristalina 1GYC, com o foco no modelo molecular do sítio catalítico, em que estão dispostos os 4 átomos de cobre. O Cu-1 é cercado por uma molécula de cisteína e duas histidinas como ligantes, a quarta posição pode ser variável, sendo algumas vezes a metionina. A coloração

azul da enzima, com absorção de banda a 614 nm, é devido à ligação covalente do cobre com a cisteína, sendo esse o sítio responsável pela oxidação do substrato.

O elétron abstraído do substrato é transferido do Cu-1 e enviado para os cobres do tipo T2 (Cu-4) e T3 (Cu-2 e Cu3), onde o oxigênio molecular é reduzido à água. O cobre T2 (Cu-4), é coordenado por duas histidinas e uma molécula de água, é um sítio em ressonância de elétrons paramagnéticos. Por possuir propriedades paramagnéticas, também é caracterizado pela sua fraca absorção no espectro visível. Os cobres T3 (Cu-2 e Cu-3), são ligados a três histidinas, com absorção de banda UV em 330 nm e fazem parte do centro binuclear da enzima, que, diferente do Cu-4, não existe ressonância magnética devido à junção antiferromagnética dos dois íons de cobre, mediada pelo grupo hidroxila. (Bassanini et al., 2021; Lin et al., 2023).

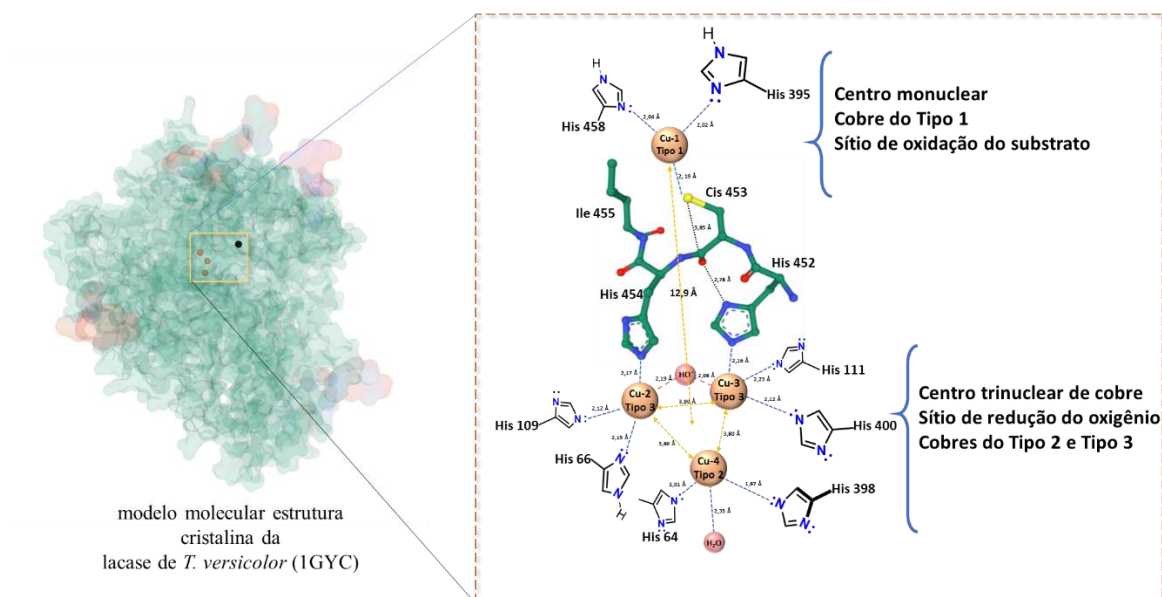


Figura 8. Modelo molecular tridimensional da estrutura cristalina da lacase de *T. versicolor*, gerada a partir do modelo 1GYC (<https://www.rcsb.org/structure/1gye>) e enfoque no modelo molecular do sítio catalítico com a disposição dos cobres do tipo T1, T2 e T3.

Nas reações em que o substrato a ser oxidado tem um potencial redox superior ao da lacase ou o substrato é muito volumoso, é necessária a presença de um mediador químico de baixa massa molecular para facilitar as reações oxidativas. Assim, esse mediador reage primeiramente com a lacase, formando um reagente oxidativo intermediário que em seguida oxida o substrato alvo, como demonstrado na Figura 9 (Bourbonnais e Paice, 1990).

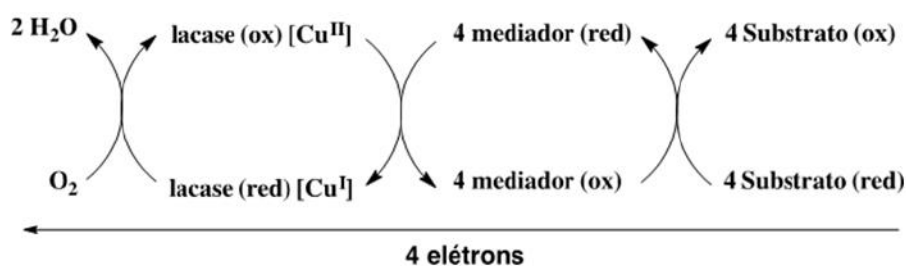


Figura 9. Esquema simplificado dos ciclos quimio-biocatalíticos do sistema lacase – mediador redox.

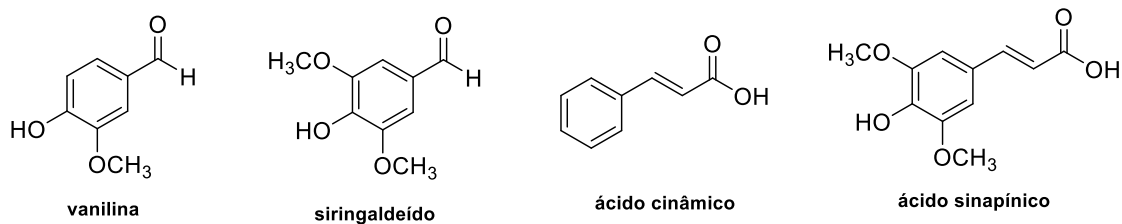
Dessa forma, o sistema lacase–mediador redox (SLM) viabiliza a oxidação de compostos não fenólicos. Nesse sistema, a lacase oxida primeiro o mediador, formando um radical livre. Esse radical reage rapidamente com o substrato, mesmo quando seu potencial redox (E_0) é mais alto que o da lacase. A escolha de um mediador adequado deve considerar que este não deve inibir a ação da enzima (Lin et al., 2023).

Apesar de frequentemente requererem mediadores, as lacases apresentam a vantagem de não demandar quantidades estequiométricas desses compostos nem a necessidade de regenerá-los por reações externas, como ocorre com muitos cofatores utilizados por outras oxidoredutases. Essa característica permite processos mais simples e econômicos, sendo uma das principais razões para o amplo uso industrial das lacases, especialmente em aplicações como biorremediação, branqueamento de celulose e modificação de compostos fenólicos (Bourbonnais; Paice, 1990).

Quando necessário, as moléculas mediadoras empregadas juntamente com as lacases podem ser naturais ou não-naturais, como os exemplos apresentados na Figura 10 (Marino et al., 2022). Os mediadores não-naturais são os mais utilizados nas reações devido a sua alta eficiência e disponibilidade comercial.

O primeiro mediador sintético relatado em um sistema lacase de *T. versicolor* – mediador para a oxidação da lignina foi o 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-sulfonato), mais conhecido pela sigla sua sigla ABTS. Outro mediador não natural empregado é o 1-hidroxibenzotriazol (HBT), o qual é empregado em processos de oxidação da lignina e no branqueamento de polpa de celulose. Já para a oxidação de álcoois primários, o mediador radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila (TEMPO) é o mais aplicado (Mani et al., 2018).

A) Mediadores redox de origem natural



B) Mediadores redox de origem não-natural

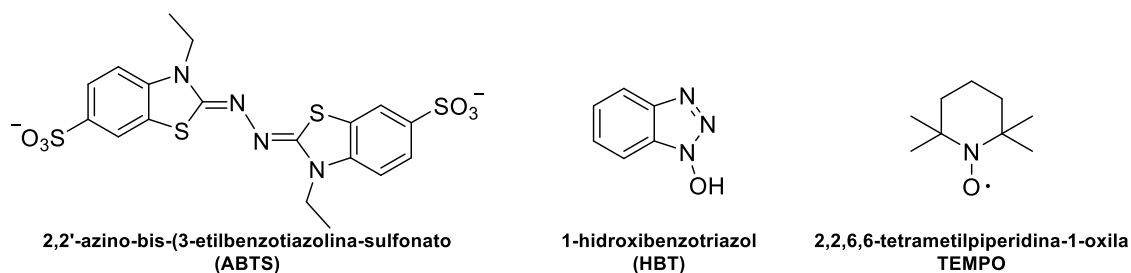


Figura 10. Moléculas naturais (A) e não naturais (B) frequentemente empregadas como mediadores redox nos sistemas oxidativos lacase – mediador.

Para o mecanismo quimio-enzimático do sistema lacase – TEMPO para a oxidação de álcoois primários (Figura 11), propõe-se que a enzima inicialmente oxida o mediador TEMPO, pela captura de um único elétron formando a espécie ativa que é o cátion oxamônio (TEMPO^+). O TEMPO^+ atua como espécie eletrofílica, interagindo com o álcool (substrato) levando a formação do intermediário **I**. O equilíbrio ácido-base do sistema leva a formação do intermediário **II**, no qual ocorre a abstração do hidrogênio na posição- α ($\text{H}\alpha$) ao grupo hidroxila do álcool. Esta abstração deve ocorrer por uma espécie com caráter básico presente no meio reacional. A abstração do $\text{H}\alpha$ leva a formação do aldeído, o principal produto do sistema quimio-enzimático, e a formação da terceira espécie de tempo envolvida no ciclo catalítico que é a hidroxilamina (2,2,6,6-tetrametilpeperidin-1-ol). Esta espécie é regenerada pela lacase ao TEMPO (Tromp et al., 2010).

Figura 11. Mecanismo quimio-biocatalítico de oxidação de álcoois primários pelo sistema lacase – TEMPO.

Os aldeídos são em geral o principal produto do sistema lacase – TEMPO. No entanto, quando é observada a oxidação de álcoois diretamente a ácidos carboxílicos, propõe-se uma oxidação em duas etapas (Galletti et al., 2014). Primeiro o álcool é oxidado ao aldeído correspondente (Figura 12), e se este tiver uma ótima solubilidade em água,

favorecerá o equilíbrio da hidratação do aldeído formando um diol geminal, sendo então substrato no ciclo químico-enzimático formando o ácido carboxílico.

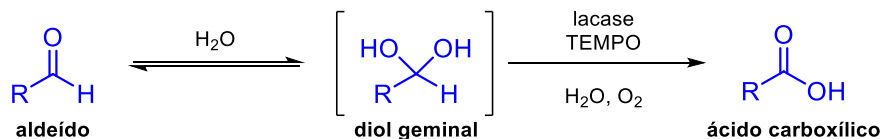


Figura 12. Oxidação de aldeídos aos correspondentes álcoois.

Um exemplo recente envolvendo sistema lacase-mediador redox, foi publicado por Silva *et al.*, (2020) para a oxidação do álcool propargílico visando a obtenção de inonas, compostos que possuem uma ligação tripla carbono-carbono diretamente ligada a um grupo carbonila de uma cetona são realizados com uso estequiométricos por métodos de excesso de oxidantes, como, cromo, manganês e iodo. Nesse contexto, o trabalho propõe o estudo de obtenção de inonas a partir da oxidação mediada por lacase/TEMPO de 1-fenilpropan-2-ol. Os autores avaliaram as reações em soluções tampão citrato, acetato, citrato/fosfato tamponadas em pH 5,0 e solução de HCl (pH 5,0). Paralelamente, foram avaliadas as fontes de oxigênio sob pressão atmosférica e borbulhando O₂ diretamente na reação. Concluíram que conversões de 93% foram obtidas em solução de HCl (pH 6,0) a 30 °C, 12,5 mM de TEMPO e 4 mg de lacase. Outro fator considerado importante foi o uso do borbulhamento de O₂ para reações realizadas em soluções tamponadas, nas quais apresentaram rendimentos próximos de 80% para tampão citrato e citrato/fosfato.

Utilizando álcool benzílico como substrato, lacase de *T. versicolor* e TEMPO como mediador em tampão acetato (pH 4,5, 100 mmol L⁻¹), em frascos abertos e ar atmosférico obteve-se como produto o benzaldeído. Entretanto, quando a reação foi submetida em frascos fechados com borbulhamento de O₂ observou-se a formação do ácido benzoico. O uso de tampão auxilia na manutenção do pH evitando a decomposição do mediador e também a desnaturação da enzima (Galletti *et al.*, 2014).

Conforme o estudo de Barreca *et al.* (2004) para a avaliação da oxidação de álcoois, foi utilizada uma solução tampão de citrato de sódio a 100 mmol L⁻¹ e pH 5,0 nas reações enzimáticas. Marino *et al.* (2022) também demonstrou a oxidação de álcool benzílico em benzaldeído com lacase, utilizando as mesmas condições de pH e concentração de tampão citrato. Liebming; Siebenhofer e Guebitz (2009) avaliaram a oxidação de glicerol em

compostos de maior valor agregado, utilizando uma solução tampão acetato a 100 mmol L^{-1} e pH 4,5.

Essa diversidade nas condições experimentais, como a variação do tipo de tampão e pH, destaca a versatilidade das lacases em atuar em diferentes processos oxidativos, adaptando-se aos substratos e condições específicas para otimização da atividade enzimática.

O trabalho de Cheng *et al.*, (2021) apresenta um estudo de otimização de solventes com o objetivo de viabilizar a oxidação de álcoois primários a ácidos carboxílicos utilizando o sistema lacase-TEMPO. Assim como outros autores citados, os pesquisadores buscam uma alternativa à oxidação convencional de álcoois que normalmente emprega reagentes tóxicos, como compostos de cromo e manganês. A oxidação de álcoois geralmente fornece a produção de aldeídos e o estudo compreende uma avaliação de diferentes solventes e pH que favoreçam a obtenção do produto ácido 2,5-furanodicarboxílico a partir do álcool 5-hidroximetilfurfural através de uma oxidação quimio-enzimática envolvendo enzima lacase e mediador TEMPO.

O estudo avaliou a oxidação em diferentes soluções tampão acetato, citrato e fosfato e identificou que as melhores conversões para a obtenção de ácido 2,5-furanodicarboxílico foram alcançadas em tampão citrato. Esse desempenho se mostrou superior aos obtidos nas condições com tampões acetato e fosfato, corroborando os dados relatados em outros trabalhos da literatura. Considerando uma conversão inicial de aproximadamente 60% em solução tampão citrato (pH 6,0, 50 mmol L^{-1}), a oxidação foi posteriormente investigada utilizando-se o mesmo tampão em diferentes concentrações, variando de 50 a 400 mmol L^{-1} . Nessa avaliação, foram obtidos rendimentos entre 76% e 82% para concentrações na faixa de 100 a 300 mmol L^{-1} , após 24 horas de reação. Esses resultados permitem concluir que a capacidade tamponante exerce um papel fundamental no aumento do rendimento da conversão de álcoois a ácidos carboxílicos, uma vez que contribui para a estabilidade do pH do meio reacional, favorecendo tanto a manutenção do íon oxoamônio — responsável pela mediação da oxidação catalisada pela enzima — quanto a hidratação do grupo aldeído.

Este último fator é essencial, pois, para que o aldeído seja eficientemente oxidado a ácido carboxílico, ele precisa estar na sua forma hidratada, isto é, como hidrato geminal. Isso ocorre quando a água se adiciona ao grupo carbonila (C=O) do aldeído, formando um geminal diol (um composto com dois grupos -OH no mesmo carbono). Nesse processo, a

molécula de água ataca o carbono eletrofílico da carbonila, resultando na abertura da ligação dupla e na formação do diol (Cheng et al., 2021). Dessa forma, os resultados demonstram que o tampão citrato se mostrou particularmente eficiente para essa conversão, não apenas pela sua adequada capacidade de manutenção do pH, mas também em fornecer um ambiente favorável à estabilidade do mediador TEMPO e à hidratação do grupo aldeído. Esses fatores, em conjunto, foram determinantes para viabilizar a oxidação completa do álcool primário ao ácido carboxílico de forma mais eficiente e com maiores rendimentos (Cheng et al., 2021)

Buscando alternativas para aplicação de subprodutos em conjunto com a sustentabilidade e valorização comercial, diversas pesquisas envolvem a oxidação de substratos mediado por enzimas. Transformar subprodutos em suprimentos úteis de valor agregado para o mercado atrai a atenção de pesquisadores (Liebminger et al., 2009).

A oxidação de álcoois primários em ácidos carboxílicos é essencial em síntese orgânica. No entanto, essa transformação geralmente acontece via catalisador químico como permanganato ou cromato, oxidantes fortes, tóxicos e onerosos. A biocatálise surge como uma aplicação verde e sustentável. No estudo, os autores demonstraram a oxidação de álcoois e aldeídos primários mediada por lacase/TEMPO em ácidos carboxílicos, em especial o 2,5-furanodicarboxílico, produto aplicado na indústria de polímeros a partir do 5-hidroximetilfurfural (Figura 13) (Cheng et al., 2021).

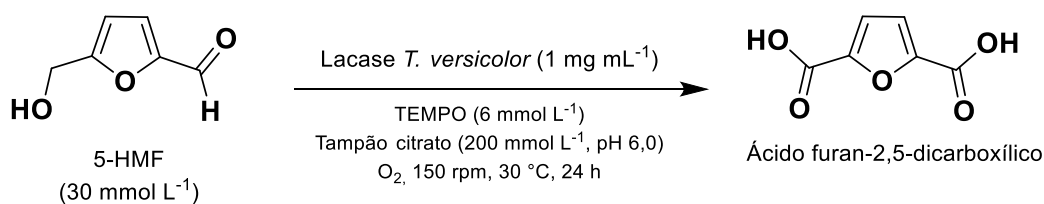


Figura 13. Esquema da oxidação do 5-hidroximetilfurfural para obtenção do 2,5-furanodicarboxílico

O estudo de Tang *et al.* (2022) apresenta a aplicação de lacase na oxidação de ácidos fenólicos para o aprimoramento de embalagens à base de colágeno. O desenvolvimento de filmes de embalagens de alimentos biodegradáveis tem atraído atenção de pesquisadores, e o colágeno, por ser um biomaterial versátil, possui diversas aplicações, como em alimentos, cosméticos, indústrias química e farmacêutica. No entanto, apesar de ser excelente substrato, o colágeno apresenta limitações, como falta de atividade antioxidante

e microbiana, baixa resistência mecânica e termoestabilidade. Para mitigar essas limitações, os autores adicionaram a filmes de colágeno, ácidos fenólicos oxidados por enzimas lacase. Esta aplicação trouxe melhoras significativas aos filmes, incluído redução da permeabilidade ao vapor de água, melhoras nas propriedades mecânicas. Além disso, os filmes modificados com ácidos fenólicos oxidados apresentaram boas capacidades antioxidantes e antimicrobianas, concluíram os autores.

3.4. Obtenção e aplicação do glicerol carbonato

O glicerol carbonato, ou 4-hidroximetil-1,3-dioxolan-2-ona (CAS 931-40-8), é um líquido incolor, não tóxico, com baixa inflamabilidade e volatilidade, biodegradável e solúvel em água e em álcoois como o metanol e etanol.

Os processos de síntese do glicerol carbonato (Figura 14) podem ser realizados por rota direta, como a reação de carboxilação oxidativa do glicerol, com monóxido de carbono, ou de forma indireta, que são os casos das reações de fosgenação, glicerólise e transesterificação do glicerol (Kaur e Ali, 2020; Ochoa-Gómez et al., 2012).

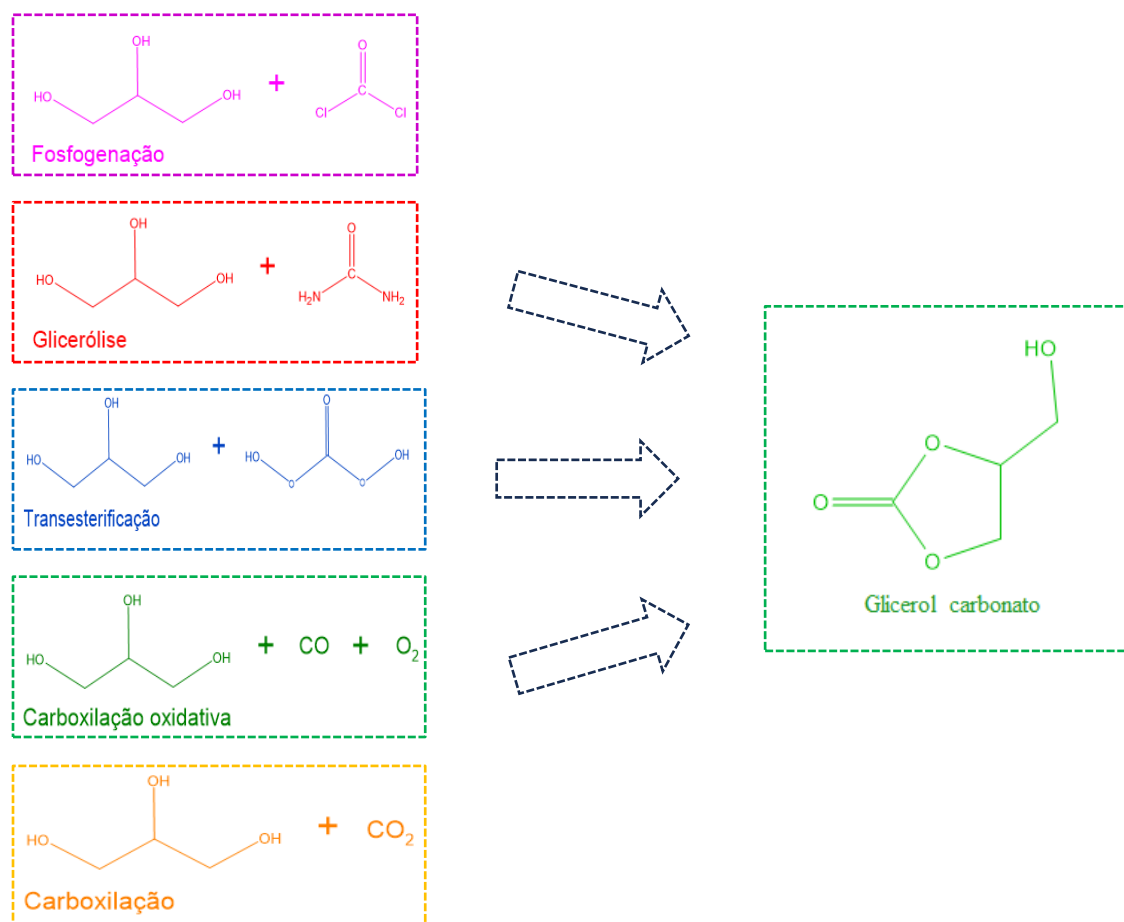


Figura 14. Rotas para obtenção do glicerol carbonato a partir do glicerol.

De acordo com Jitjamnong *et al.* (2023), muitos desses processos foram industrializados, mas alguns apresentam desvantagens significativas, como é o caso das técnicas de fosfogeneação, carboxilação oxidativa e glicerólise. Os processos com uso de reagente fosgênio e monóxido de carbono apresentam elevada toxicidade, os quais requerem rigorosos controles de segurança. O processo de glicerólise, que emprega ureia em quantidade equimolares como fonte do grupo carbonila (C=O), leva a formação de amônia como coproduto, que precisa ser cuidadosamente removida devido a toxicidade. Além disso, esses processos requerem temperaturas mais elevadas, entre 130-150 °C, o que as tornaram processos descontinuados (Inrirai *et al.*, 2024).

A rota direta pela reação do glicerol com CO_2 parece ser a escolha mais adequada, já que ambos são produtos renováveis e com baixo custo. No entanto, em razão da alta estabilidade do CO_2 , os valores de conversão são baixos, não ultrapassando 32%, conforme citado por Ochoa-Gómez *et al.* (2012).

Outra rota indireta e muito utilizada atualmente é a transesterificação com carbonatos orgânicos, sendo o dimetilcarbonato (DMC) o mais comumente utilizado. O DMC pode ser considerado uma substância que apresenta baixo impacto ambiental, não-tóxica e biodegradável, como representado na Figura 15. Outros carbonatos orgânicos também podem ser empregados, como o carbonato de dietila (DEC), o carbonato de etileno (EC) e o carbonato de propileno (PC), porém este último tem seu uso limitado devido seu alto ponto de ebulição (Inrirai et al., 2024).

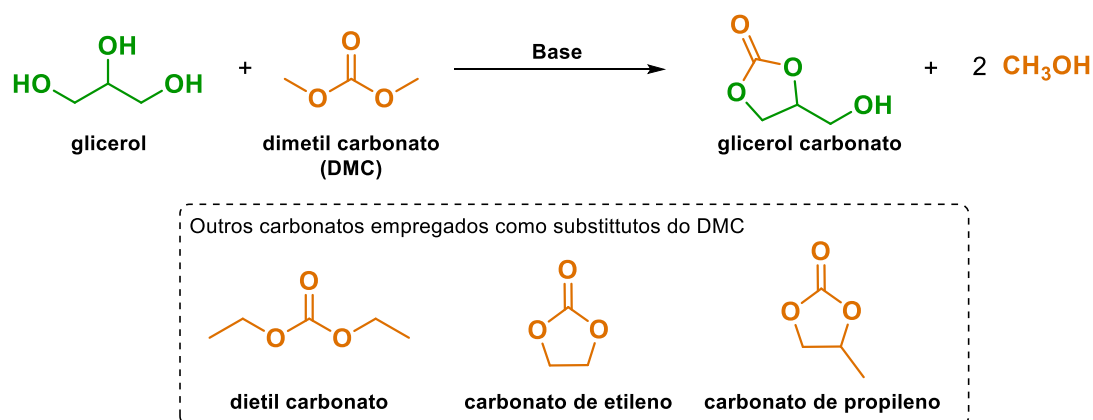


Figura 15. Reação de transesterificação do glicerol com dimetilcarbonato promovida por base para a obtenção do glicerol carbonato.

A reação de transesterificação, em geral, ocorre na presença de catalisadores alcalinos, como o NaOH, KOH e K_2CO_3 , que atuam em uma catálise homogênea. No entanto, o uso destes catalisadores apresenta a desvantagem de não serem recuperáveis e reutilizáveis. Em contraste, catalisadores heterogêneos, como óxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, hidrotalcita e metais de transição suportados em óxidos, são preferidos devido à sua fácil remoção do meio reacional, que pode ser realizada por métodos como filtração, centrifugação ou separação magnética (Pattanaik et al., 2021).

Segundo Ochoa-Gómez et al. (2012) a obtenção de glicerol carbonato a partir do glicerol e carbonato de etileno utilizando, óxido de alumínio ou cálcio como catalisadores, é realizada com temperaturas inferiores a $35\text{ }^\circ\text{C}$, alcançando uma conversão de 98%. Para a reação utilizando dimetilcarbonato é necessária temperatura superior a $80\text{ }^\circ\text{C}$, porém essa diferença se iguala na etapa de separação por destilação, em que o carbonato de etileno necessita de uma temperatura elevada, visto que seu ponto de ebulição é $248\text{ }^\circ\text{C}$, diferentemente do dimetilcarbonato, de $90\text{ }^\circ\text{C}$.

A biocatálise também já foi empregada como estratégia sintética para a obtenção do glicerol carbonato. A lipase B de *Candida antarctica* e a versão suportada, a Novozyme 435, se destacaram dentre outras lipases como biocatalisadores na transesterificação do glicerol com DMC, chegando a valores de conversão de 90% quando a reação foi conduzida sem a adição de um solvente, e até 100% de conversão quando tetraidrofurano (THF) foi empregado como cossolvente (Ochoa-Gómez et al., 2012).

A versatilidade em se obter glicerol carbonato atrai atenção pelas diversas possibilidades de aplicação industrial no desenvolvimento de produtos, como exemplo, Galletti *et al.*, (2022) mencionam algumas dessas aplicações, incluindo seu uso em polímeros, produtos farmacêuticos, como transportador de solução eletrolítica para baterias, e como agente umectante na linha cosmética. Outras aplicações mais específicas, como a preparação de poliéster, policarbonatos, poliuretanos, adesivos, revestimentos e lubrificantes são destacadas por Pattanaik *et al.*, (2021). De acordo com Kaur e Ali, (2020) o glicerol carbonato pode ser aplicado como solvente, ingrediente eletrolítico, precursor para síntese de detergente e intermediário para síntese de polímeros e resinas. Essas características fazem do glicerol carbonato um composto promissor em diversas indústrias, desde a química até a eletrônica, devido à sua natureza multifuncional.

3.5. Síntese e aplicações do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

O ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico (AODC) que é o produto da oxidação do glicerol carbonato, possui até o momento poucas citações na literatura científica e técnica. Uma busca pela molécula na base de dados CAS Scifinder (*American Chemical Society*, 2024), leva ao resultado de 27 registros. Dentre os resultados, 26 são referentes a documentos de patentes, sendo que muitos são pedidos registrados pela mesma empresa em diferentes escritórios e países diferentes, e apenas um resultado referente a artigo científico, o qual está redigido na língua chinesa (Gu et al., 2012). Nesta publicação, o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico é empregado como um modificador da superfície de nanopartículas de sílica.

Com base na tradução do procedimento, interpretou-se que para a oxidação foi realizada empregado um excesso de permanganato de potássio (KMnO₄) (Figura 16), que foi adicionado lentamente na solução aquosa do glicerol carbonato, acompanhando o desaparecimento da cor roxa que é característica de uma solução de KMnO₄. Sem relatar o

tempo necessário para a oxidação, os autores descrevem que ao não ser mais observado o desaparecimento da cor, o excesso do oxidante deve ser reduzido com sulfito de sódio (Na_2SO_3) e posteriormente a solução filtrada. A solução é então acidificada com solução de ácido clorídrico e a água é removida, formando um sólido branco. Uma descrição na sequência instrui que acetonitrila deve ser adicionada ao sólido e a mistura agitada por 24 h. Após, deve ser realizada a filtração e o solvente do filtrado evaporado levando ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico. No entanto, no artigo não há menção sobre conversão do glicerol carbonato ou rendimento do produto, bem como qualquer informação sobre a caracterização química.

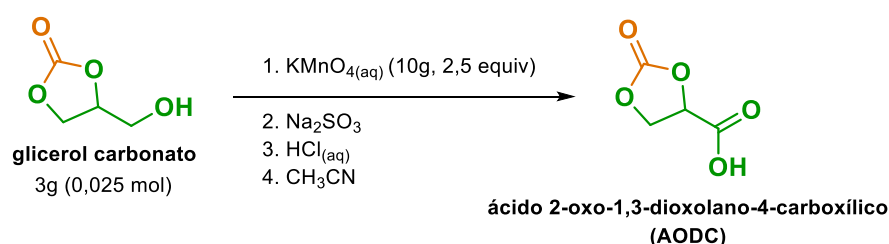


Figura 16. Síntese química do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico empregando permanganato de potássio.

Na patente de aplicação US2015/0353521A1 (Wölfle et al., 2015), intitulada *2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxamide building blocks, their preparation and use*, o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico é utilizado como um material de partida para o preparo de monômeros a serem empregados como uma versão não-isocianato para o preparo de poliuretanos. Como mencionado na patente, há uma busca pela substituição de isocianatos como monômeros de poliuretanos devido a sua toxicidade. Derivados de glicerol, como o glicerol carbonato modificados emergem como uma alternativa promissora para a produção desses polímeros.

O método descrito da patente é uma adaptação do método desenvolvido por De Luca et al. (2003). Neste trabalho, os autores propõem o emprego do radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) como agente de oxidação de uma variedade de álcoois primários e secundários aos respectivos ácidos carboxílicos. A regeneração do TEMPO é promovida pelo ácido 1,3,5-tricloroisocianúrico (Figura 17).

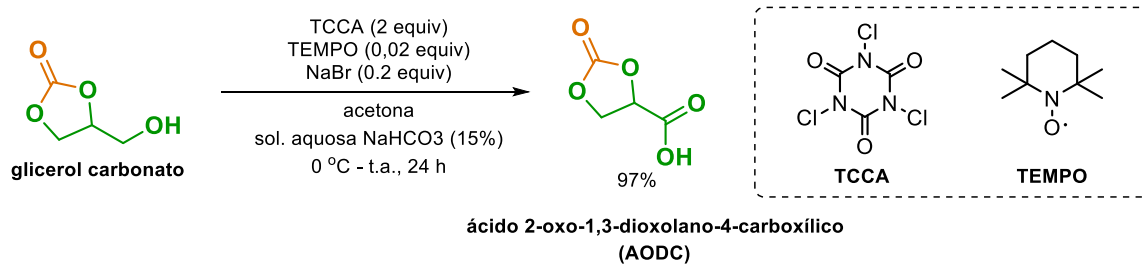


Figura 17. Síntese química do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico empregando o sistema oxidante TEMPO - TCCA.

De acordo com a patente o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico é obtido com 97% de rendimento e são apresentados os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C . Desta forma, no contexto que se apresenta das possibilidades de aplicação do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico na indústria química e visando o uso da biocatálise como ferramenta sintética que está alinhada aos princípios da química verde e do desenvolvimento sustentável, vislumbramos que a enzima lacase, reconhecida pelo seu poder catalítico na oxidação de álcoois pode promover nas condições adequadas a transformação do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes, solventes e outros materiais

Os reagentes ácido cítrico (99,5%, Sigma Aldrich), citrato de sódio (99%, Sigma Aldrich), radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila (TEMPO) (99%, Sigma-Aldrich) e sílica gel 60 Å (230–400 mesh, tamanho de partícula de 40–63 µm) foram utilizados sem prévia purificação. O glicerol carbonato, empregado como substrato, foi sintetizado empregando o método descrito na seção 4.2.2. A água ultrapura do tipo I que foi utilizada para a preparação das soluções tampão e como eluente nas análises por CLAE foi obtida em sistema Milli-Q[®]. A enzima lacase de *Trametes versicolor* foi obtida comercialmente (>0,5 U/mg, Sigma Aldrich) e mantida a 4 °C. A atividade enzimática foi avaliada previamente aos experimentos de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.5.

4.2. Métodos

4.2.1. Instrumentação analítica

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H e ¹³C) foram registrados em um Espectrômetro Bruker[®], modelo Fourier 300, de campo magnético de 9,4 Tesla, que opera a 300,18 MHz para o núcleo de ¹H e 75,48 MHz para o núcleo de ¹³C. Para a aquisição, as amostras foram analisadas em tubos de 5 mm, na temperatura de 300 K, no solvente deuterado apropriado.

Os espectros de massas de alta resolução (EMAR) foram obtidos em um espectrômetro Bruker[®] (Daltonics), equipado com fonte de ionização por electrospray (QToF-ESI), operando no modo negativo, para a confirmação dos produtos obtidos nas reações química e enzimática.

4.2.2. Síntese do glicerol carbonato

Em um frasco de fundo redondo, munido de agitação magnética e condensador de refluxo foram adicionados 1,842 g (20 mmol) de glicerol, 5,0 mL (6,400g, 70 mmol, 3,5 equiv) de dimetil carbonato e 0,074 g (4% m/m) de CaO. A mistura foi aquecida a 95 °C

por 135 minutos. Após, a mistura foi filtrada e o sólido remanescente lavado com etanol (20 mL). O solvente foi removido sob pressão reduzida em um evaporador rotativo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila e hexano, na proporção de 7:3. O glicerol carbonado foi obtido como um líquido incolor, com 83% de rendimento (1,960 g).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5,31 (t, $J = 7$ Hz, 1H), 4,79 (ddd, $J = 10,5$; 7, 3,5 Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 10,5$ Hz, 1H), 4,28 (dd, $J = 10,5$, 7 Hz, 1H), 3,67 (ddd, $J = 14$, 7; 3,5 Hz, 1H), 3,53-3,46 (m, 1H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 155,7; 77,4; 66,3; 61,01.

4.2.3. Síntese química para obtenção do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

O ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita na patente US 2025/0353521 A1 (Wölflé et al., 2015) com algumas modificações. Em um frasco de fundo redondo, mantido sob banho de gelo e agitação, foram adicionados 0,590 g (5 mmol) de glicerol carbonato, 25 mL de acetona, 15 mL de uma solução aquosa com 15% (m/v) de NaHCO_3 , 0,100 g (1 mmol, 0,2 equiv) de NaBr, 0,08 g (0,1 mmol 0,02 equiv) de TEMPO e, por fim, foi em porções 2,687 g (86% de pureza, 10 mmol, 2,0 equiv) de ácido tricloisocianúrico (TCCA). Após a adição de todos os componentes, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional deixada para atingir a temperatura ambiente, mantendo a agitação por 24 h. Ao final das 24 h, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e ao resíduo foi adicionado 40 mL de metanol e a mistura mantida sob agitação por 20 min. O sólido suspenso, formado na solução metanólica, foi removido por centrifugação a 5000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi separado por decantação, filtrado e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica, e as frações cromatográficas acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Inicialmente a coluna foi eluída com 60 mL de uma mistura de etanol e acetato de etila (1:9), seguido de 50 mL da mesma mistura de solventes na proporção 2:8 e por fim eluída com apenas etanol. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e o produto obtido como um sólido ceroso com 25% de rendimento (0,168 g).

RMN de ^1H (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 5,08 (dd, $^2J = 9,37$ Hz, $^3J = 6,43$ Hz, 1H), 4,76 (dd, $^2J = 9,37$ Hz, $^3J = 8,56$ Hz, 1 H), 4,45 (dd, $^3J = 8,56$ Hz, $^3J = 6,43$ Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 172,1; 157,5; 74,3; 68,9.

EMAR [ESI (-)]: Calculado para $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_5$, $[\text{M-H}]^-$: 130,9975, encontrado 130,9973.

4.2.4. Preparo das soluções tampão para síntese enzimática

As soluções tampão de acetato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio, fosfato de potássio e citrato-fosfato foram preparadas em balões volumétricos de 100 mL, conforme procedimentos descritos em Morita e Assunção (2007). Para o preparo das soluções tampão, os reagentes foram solubilizados em água ultrapura tipo 1 e o valor do pH foi aferido em pHmetro de bancada (Digimed, modelo DM 22), sendo que, quando necessário o valor de pH foi ajustado com soluções de NaOH (100 mmol L^{-1}). As soluções tampão foram armazenadas em frasco âmbar e acondicionadas sob refrigeração.

4.2.5. Medida da atividade enzimática da lacase comercial de *Trametes versicolor*

O ensaio de atividade enzimática foi realizado a partir da técnica de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), em um espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo Genesys 150, empregando o substrato siringaldazina. Inicialmente, foram preparadas as soluções de tampão de fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 6,5), solução de siringaldazina ($0,216 \text{ mmol L}^{-1}$) e uma solução da lacase de *T. versicolor* na concentração de 14 mg mL^{-1} , cuja concentração foi definida a partir do método descrito pelo fabricante. Em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm, contendo uma barra magnética de 5x2 mm, foram adicionados 2,20 mL da solução tampão fosfato de potássio e 0,3 mL da solução de siringaldazina. A cubeta foi acondicionada no módulo Peltier (modelo 840-306600), em temperatura de 30°C e 100% de agitação. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL da solução de lacase e imediatamente iniciou-se o registro da absorbância no comprimento de onda de 530 nm, por um período de 2 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata e o valor para a atividade enzimática foi obtida a partir da Equação 1.

$$\text{Atividade (U)} = \left(\frac{\Delta \text{Abs}}{\varepsilon \times l} \right) \times 10^6 \quad (1)$$

Onde:

ΔAbs : Inclinação da curva obtida por regressão linear a partir da absorbância *versus* tempo.

ε : Absortividade molar da siringaldazina ($65000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

l : Caminho óptico (cm).

A atividade específica, a qual corresponde a atividade enzimática (U) por unidade de massa (mg) foi determinada empregando a Equação 2.

$$\text{Atividade (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Atividade (U)}}{\text{lacase (mg mL}^{-1}\text{)}} \quad (2)$$

Onde:

Atividade (U): Atividade enzimática obtida no ensaio em U mL^{-1} .

Lacase (mg mL^{-1}): concentração da solução de lacase no ensaio de atividade em mg mL^{-1} .

Por definição, uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima que converte $1 \mu\text{mol}$ do substrato por minuto, nas condições estabelecidas no ensaio.

4.2.6. Procedimentos experimentais de otimização para a síntese quimio-enzimática do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Todas as reações de otimização das condições reacionais de conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico foram realizadas em um agitador termostatizado (banho seco) Kasvi, modelo K80200, empregando vials tipo *headspace*, com volume de 20 mL. Como procedimento geral, foi adotado as seguintes condições: no vial foram adicionados 0,05 g (0,42 mmol) de glicerol carbonato, 0,023 g (0,15 mmol, 0.35 equiv) de TEMPO e 0,007 g (9 U) da lacase comercial de *T. versicolor*. Em seguida, foi adicionado 5 mL da solução tampão. Os vials foram selados e uma atmosfera de oxigênio foi estabelecida com a adição de uma linha de gás oxigênio acondicionado em uma bexiga inflável. O sistema foi mantido sob agitação em 500 rpm, nas condições de temperatura e tempo de reação estipulados nos estudos de otimização.

Todas as condições de reação foram realizadas em triplicata e a conversão do glicerol carbonato foi acompanhada pela análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas condições descritas a seguir.

4.2.7. Determinação da conversão do glicerol carbonato por cromatografia líquida de alta eficiência

A conversão do glicerol carbonato foi determinada a partir de uma curva analítica gerada a partir da relação entre 10 diferentes concentrações do glicerol carbonato e as respectivas áreas dos picos cromatográficos correspondentes. A partir de uma solução mãe de 20,0 g L⁻¹, foram preparadas de forma seriada mais 9 diluições, sendo estas: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 e 16,0 g L⁻¹. Todas as diluições foram preparadas em triplicata. As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-20AD equipado com detector de índice de refração (RID-20A). As seguintes condições de análise foram estabelecidas: coluna cromatográfica Phenomenex, modelo Rezex® RHM-monossacarídeo (300 mm × 7,8 mm, tamanho de partícula de 8 µm), temperatura da coluna a 75 °C, fase móvel composta por uma solução aquosa de H₂SO₄ 5 mmol L⁻¹, fluxo constante de 0,6 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL.

A linearidade foi determinada a partir do coeficiente de determinação (R²) calculado, e os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram determinados de acordo com as Equação 3 e 4, respectivamente.

$$LQ = \frac{10 \times \bar{s}}{\overline{IC}} \quad (3)$$

$$LD = \frac{3,3 \times \bar{s}}{\overline{IC}} \quad (4)$$

Onde:

$\bar{s}$: média do desvio padrão do intercepto com eixo Y obtido a partir da curva analítica;

$\overline{IC}$: coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.

4.2.8. Escalonamento da síntese quimio-enzimática do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Em um frasco de fundo redondo, munido de agitação magnética, e mantido a 30 °C por meio de um banho seco com temperatura controlada eletronicamente, foram adicionados 0,5 g (2,2 mmol) de glicerol carbonato, 50 mL de solução tampão citrato (100 mmol L⁻¹, pH 5,0), 0,2 g (1,5 mmol) de TEMPO e 0,07 g (90 U) da lacase comercial de *T. versicolor*. O sistema foi fechado e, por meio de uma bexiga inflável e uma agulha, foi estabelecida no sistema uma atmosfera enriquecida com gás oxigênio. O sistema foi mantido sob agitação a 30 °C, por 24 h. Após, a mistura reacional foi extraída com cicloexano (5 x 10 mL) para a remoção do TEMPO e a posteriormente a água foi evaporada sob pressão reduzida. O sólido remanescente foi purificado por cromatografia em coluna de sílica utilizando como eluente 40 mL de uma mistura de 20% etanol em acetato de etila, seguido de 50 mL de uma mistura de 60% de etanol em acetato de etila. A eluição do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, utilizando como eluente uma mistura de 60% de etanol em acetato de etila. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo de solvente removido sob alto vácuo. O produto purificado foi obtido como um sólido incolor, higroscópico, e com 66% de rendimento (0,368 g).

RMN de ¹H (300 MHz, D₂O) δ (ppm): 5,08 (dd, ²J = 9,37 Hz, ³J = 6,43 Hz, 1H), 4,76 (dd, ²J = 9,37 Hz, ³J = 8,56 Hz, 1 H), 4,45 (dd, ³J = 8,56 Hz, ³J = 6,43 Hz, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, D₂O) δ (ppm): 172,1; 157,5; 74,3; 68,9.

EMAR [ESI (-)]: Calculado para C₄H₃O₅, [M-H]⁻: 130,9975, encontrado 130,9973.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese do substrato glicerol carbonato a partir de glicerol

O glicerol carbono foi preparado a partir da reação de transesterificação do glicerol com o dimetil carbonato, empregando o CaO (4% m/m) como catalisador (Figura 18). As condições reacionais foram empregadas com base em um estudo em andamento no laboratório, com base em um delineamento experimental, os quais ainda não estão publicados. O glicerol carbonato foi obtido com um rendimento de 95% após a purificação por coluna cromatográfica. A estrutura molecular foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C e EMAR. A pureza do produto foi avaliada por CLAE, onde foi observada a ausência de glicerol. O glicerol carbonato obtido foi então empregado como padrão analítico e substrato nos estudos subsequentes.

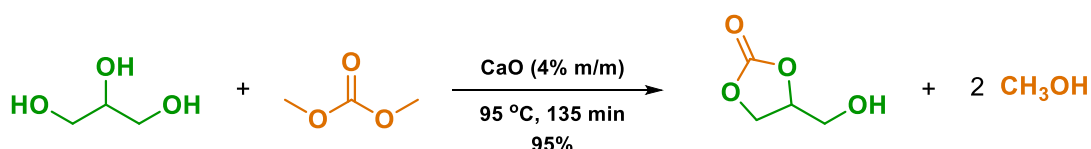


Figura 18. Síntese de glicerol carbonato a partir do glicerol e dimetil carbonato.

5.2. Síntese do padrão do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Conforme discutido na seção 3.5, o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico apresenta poucos relatos na literatura, sendo que os dois documentos encontrados não detalham a extração e a purificação do ácido. No entanto, empregou-se a o procedimento reportado na patente US 2015/0353521A1, considerando que este apresenta um procedimento experimental com um melhor detalhamento, e porque também é citado que o procedimento adotado é uma modificação do procedimento reportado por De Luca *et al.*, (2003). Ainda, a patente reporta dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C .

Na publicação de 2003, os autores empregam um sistema oxidativo constituído do TEMPO, ácido tricloroisucianúrico (TCCA) e NaBr, em uma mistura de acetona e solução aquosa de NaHCO_3 (15%) com solvente. Neste trabalho não são empregados como substratos o glicerol, ou derivados do glicerol como o solketal ou até mesmo o glicerol carbonato.

O procedimento apresentado na patente utiliza os mesmos reagentes e nas mesmas proporções. No entanto, a etapa final de finalização (*quenching*) da reação e a extração são modificados, fazendo uso de uma etapa de refluxo do produto com o solvente clorofórmio. O propósito desta etapa não é mencionado pelos autores da patente.

Desta forma, foram realizadas algumas tentativas da síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico, em que o procedimento experimental otimizado é ilustrado na Figura 19, e detalhado nos materiais e métodos, seção 4.2.3. A etapa de refluxo com clorofórmio não se mostrou necessária, e o produto foi obtido como um sólido ceroso com rendimento de 25%.

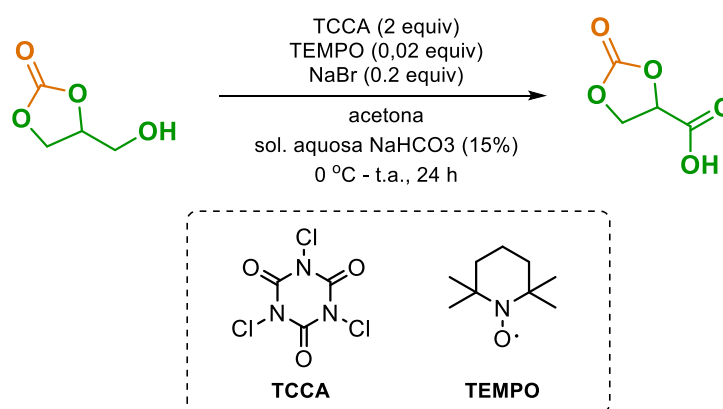


Figura 19. Equação química para a síntese do padrão do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Inicialmente foi realizada uma análise por EMAR para confirmar a presença do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico. Como pode ser observado no espectro de massas demonstrado na Figura 20A, o produto desejado foi identificado no modo negativo, como molécula desprotonada $[M-H]^-$, com m/z de 130,9973. A massa detectada, bem como o perfil isotópico é correspondente à massa exata calculada para fórmula elemental $C_4H_3O_5$ $[M-H]^-$, bem como o perfil isotópico esperado (Figura 20B). Na mesma análise, foi também observada a m/z de 262,9977, a qual corresponde ao respectivo dímero desprotonado $[2M-H]^-$, cuja massa registrada está de acordo com a massa exata calculada para a fórmula elemental $C_8H_7O_{10}$ $[2M-H]^-$, que é 263,0034.

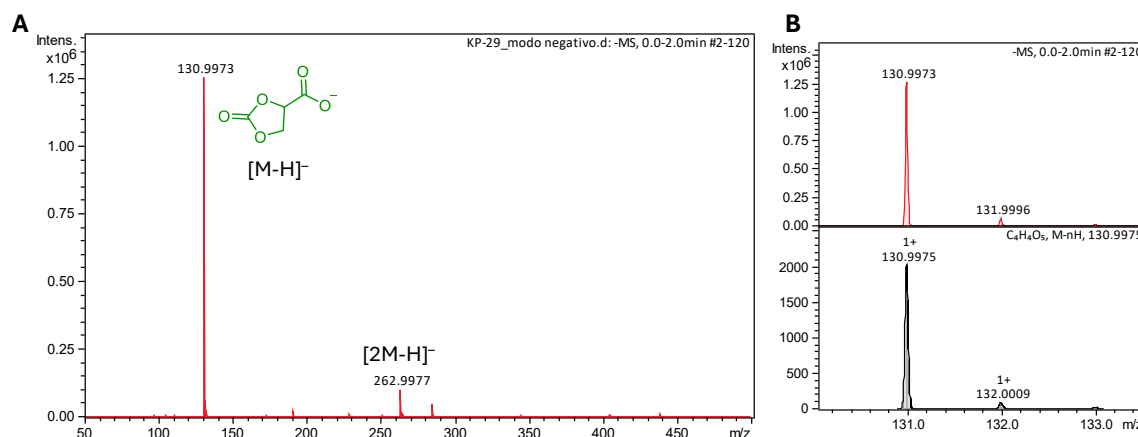


Figura 20. (A) espectro de massas da reação de síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico e (B) comparação entre o pico registrado para (acima) o espectro simulado (abaixo) para a fórmula elementar C₄H₃O₅ [M-H]⁻.

A análise por CLAE revelou um pico intenso com tempo de retenção (t_R) de 11,1 min o qual a este foi atribuído o ácido, como demonstrado na Figura 21. No t_R de 17,6 min é observado o pico cromatográfico referente ao glicerol carbonato, o qual pode ser comparado com o perfil cromatográfico deste reagente quando puro. A boa separação entre os picos do substrato e do produto são importantes para uma adequada avaliação da conversão.

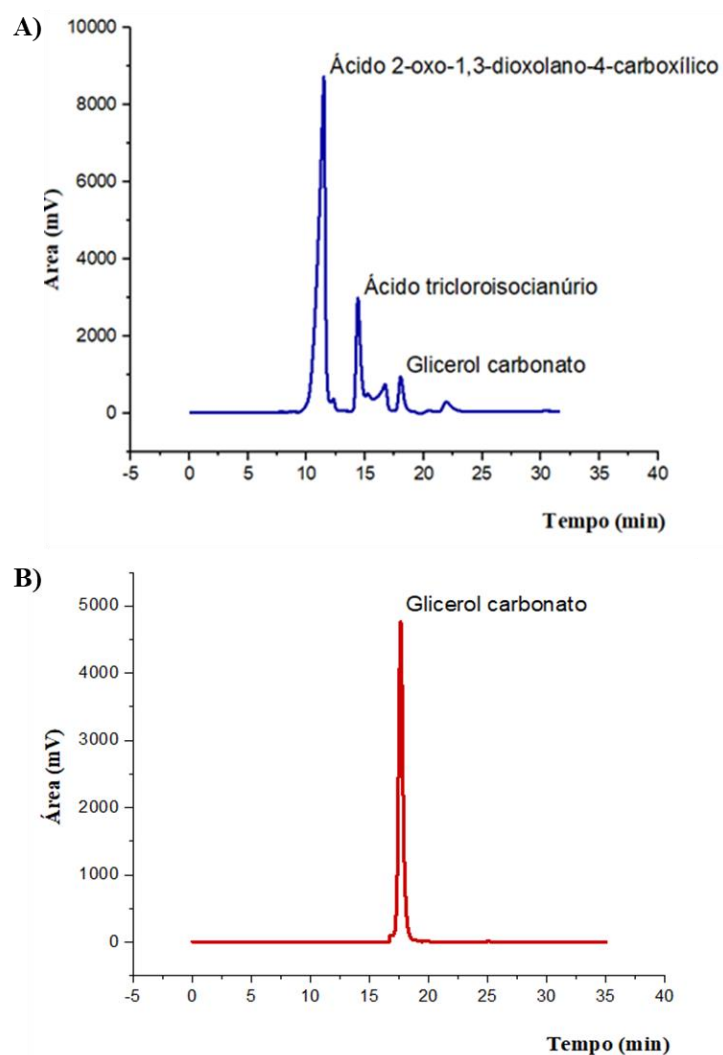


Figura 21. Cromatograma obtido da análise do produto da reação de síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico e cromatograma do glicerol carbonato.

5.3. Estudo de linearidade para curva analítica na avaliação da conversão de glicerol carbonato por cromatografia líquida de alta eficiência

Com os perfis cromatográficos estabelecidos para o substrato e para o produto, foi definido que o consumo do glicerol carbonato na reação seria utilizado com fator resposta para determinar a conversão. Para o acompanhamento das conversões por CLAE foi construída uma curva analítica com dez diferentes concentrações de glicerol carbonato, sendo estas: 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16 e 20 g L⁻¹. As soluções foram preparadas a partir de uma solução mãe de glicerol carbonato de concentração de 20 g L⁻¹, e a concentrações subsequentes a partir da diluição seriada. Foi utilizado o detector de índice de refração uma

vez que tanto o substrato, quanto o produto não possuem grupos cromóforos e, portanto, não absorvem com intensidade no espectro do ultravioleta.

A Figura 22A apresenta graficamente a sobreposição dos picos cromatográficos obtidos a partir das análises das 10 diferentes concentrações de glicerol carbonato. Observa-se que o pico correspondente ao glicerol carbonato é detectado com t_R 17,6 minutos, e a sobreposição dos picos revela que independente da concentração analisada há uma resolução cromatográfica adequada e consistência na retenção do analito. Os picos são simétricos e centrados, o que são desejáveis para uma análise precisa. Já o gráfico mostrado na Figura 22B apresenta a curva analítica plotada a partir da média das áreas para análises em triplicata.

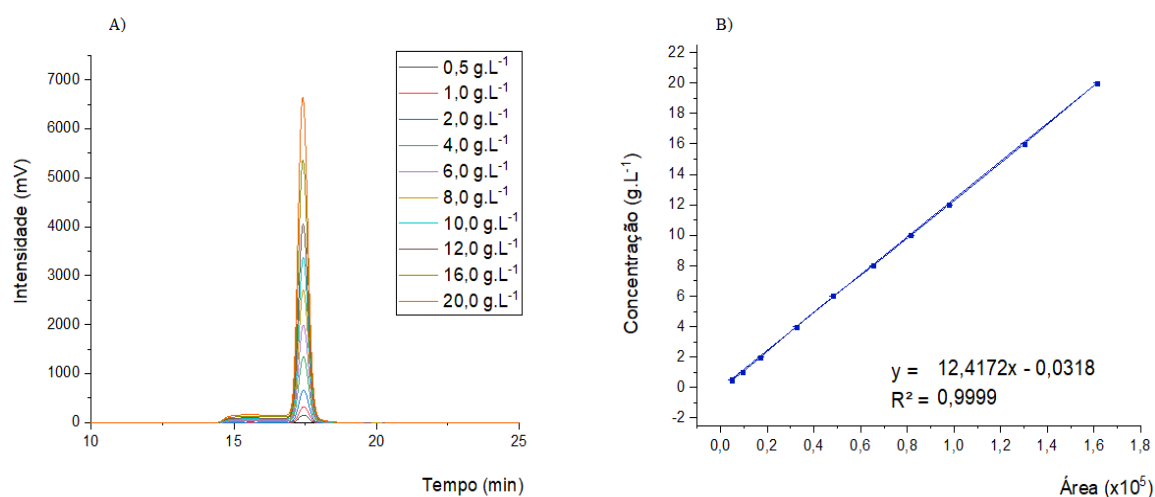


Figura 22. (A) sobreposição dos cromatogramas registrados para as dez concentrações de glicerol carbonato e (B) curva analítica gerada a partir das concentrações analisadas e relacionadas a área correspondente aos picos cromatográficos.

Definir a linearidade de um método analítico é demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade é uma determinação do ajuste por regressão linear e avaliação do perfil gráfico dos resíduos da regressão (INMETRO, 2020). O coeficiente de determinação (R^2) calculado foi de 0,9999, sendo assim superior a 0,9945, o qual é o indicativo da qualidade da curva analítica. Dessa forma, a linearidade obtida indica que o modelo explica 99,99% da variabilidade dos dados de resposta ao redor de sua média, estando acima do critério estabelecido no documento orientativo para validação de métodos (INMETRO, 2020).

A Tabela 1 apresenta a comparação entre os valores das concentrações estipuladas e a concentração resultante do modelo gerado a partir da curva analítica, resultando desta forma os resíduos. A análise dos resíduos mostra que estes seguem uma ordem aleatória, indicando a ausência de erros sistemáticos e tendências.

Tabela 1. Dados obtidos na determinação da linearidade do método de quantificação de glicerol carbonato

Concentração estipuladas para as soluções (g L ⁻¹)	Concentração experimental (g L ⁻¹)	Resíduos
0,5	0,4787	0,0213
1,0	1,0149	-0,0149
2,0	2,0801	-0,0801
4,0	3,9323	0,0677
6,0	5,9482	0,0518
8,0	8,0036	-0,0036
10,0	10,0016	-0,0016
12,0	12,0270	-0,0270
16,0	16,0565	-0,0565
20,0	19,9573	0,0427

Na Figura 23, estão plotados os resíduos gerados, permitindo observar graficamente que não existem tendências entre os valores, o que confirma que o modelo é adequado para o método (INMETRO, 2020).

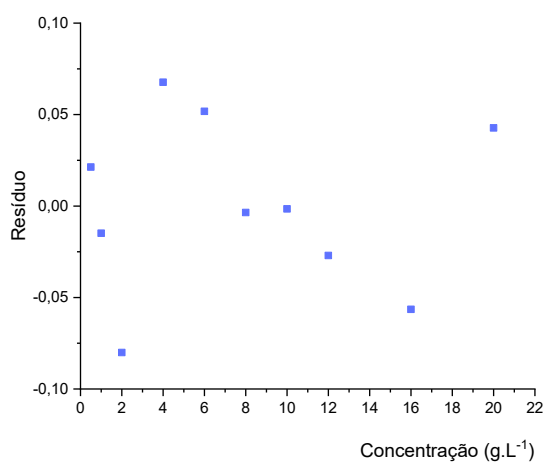


Figura 23. Gráfico da relação entre resíduo em função da concentração de glicerol carbonato obtidos pela curva de calibração.

A avaliação da linearidade, um dos critérios estabelecidos por guias de validação de métodos analíticos, é fundamental para o método definido na quantificação da conversão do glicerol carbonato no produto de interesse. Essa verificação garante que a resposta do detector seja proporcional à concentração do analito dentro de uma faixa específica, assegurando a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

5.3.1. Estudo de limite de quantificação (LQ) e detecção (LD) para a técnica por HPLC

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão e o limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. A quantificação de baixos níveis do analito na amostra, requer a necessidade em identificar a menor concentração que pode ser detectada pelo método (INMETRO, 2020).

Os limites de quantificação e detecção foram determinados a partir da estimativa da curva analítica, utilizando a média das inclinações e interceptos obtidos a partir das equações das retas. A Tabela 2 apresenta os dados obtidos em triplicata para as áreas dos picos cromatográficos correspondentes às 10 concentrações preparadas.

Tabela 2. Dados para obtenção do limite de quantificação e detecção de glicerol carbonato

Concentração estipuladas para as soluções (g L ⁻¹)	Área das curvas		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	4585	4340	4056
1,0	9230	8583	8133
2,0	17136	16840	17733
4,0	32369	32017	32109
6,0	48278	48501	48464
8,0	65351	64840	64751
10,0	81462	80519	81278
12,0	97906	96740	97590
16,0	129989	129246	130440
20,0	161251	161160	161588
Inclinação	8051,9	8039,8	8089,6
Intercepto	743,02	362,33	301,64
Desvio padrão intercepto		239,24	
Média Inclinação		8060,43	
LQ (g L⁻¹)		0,30	
LD (g L⁻¹)		0,10	

O LQ foi determinado a partir da estimativa da curva analítica, utilizando a média das inclinações e interceptos obtidos a partir das equações das retas, sendo encontrado um LQ de $0,30 \text{ g L}^{-1}$. Já o LD, obtido pelo emprego da Equação 4, resultou em uma concentração de $0,10 \text{ g L}^{-1}$. Esse valor representa o menor nível detectável pelo método, embora sem a garantia de uma quantificação precisa. Dessa forma, os valores obtidos para LD e LQ confirmam que o método desenvolvido apresenta sensibilidade adequada para a detecção e quantificação do analito nas condições propostas.

5.4. Avaliação da atividade enzimática da lacase comercial de *T. versicolor*

A atividade enzimática foi determinada conforme a metodologia fornecida pelo fabricante (Sigma-Aldrich - Lote: BCCK0654) e detalhada na seção 4.2.5. A atividade da lacase comercial de *T. versicolor* foi medida espectroscopicamente a partir da taxa de consumo do substrato siringaldazina nos minutos iniciais do experimento. Este consumo do substrato é medido a partir do produto de oxidação, o tetrametoxi-azo-bismetilenoquinona (TMAMQ) o qual possui absorção em 530 nm, como mostrado na equação química na Figura 24A.

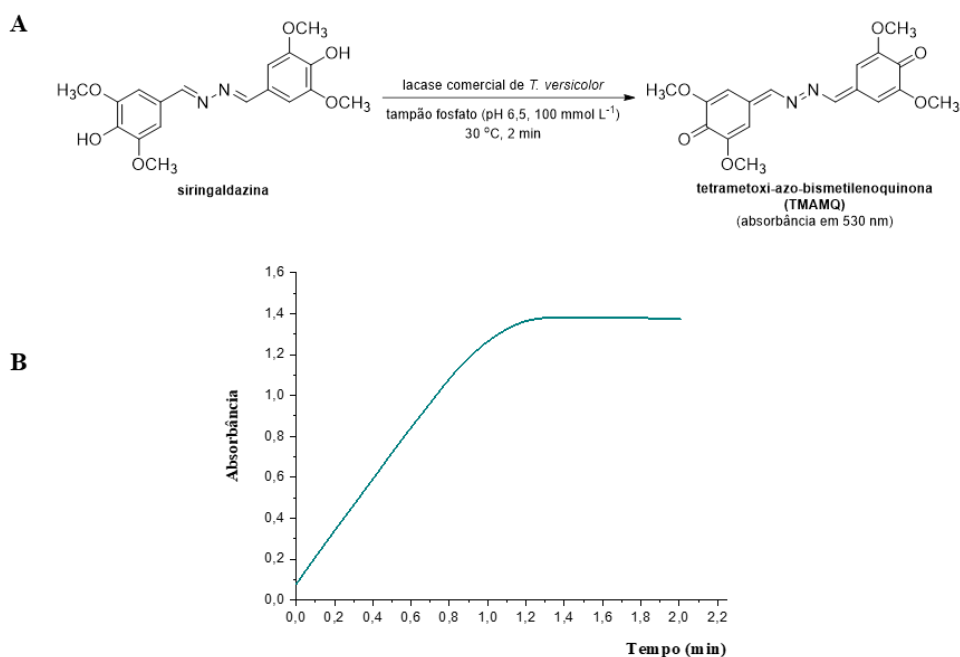


Figura 24. (A) equação química para a reação de oxidação da siringaldazina pela lacase de *T. versicolor* com a formação do produto tetrametoxi-azo-bismetilenoquinona e, (B) gráfico resultante da absorbância em 530 nm função do tempo.

A atividade enzimática foi determinada com base na lei de Lambert-Beer com a medição direta do incremento da absorbância em 530 nm. A variação da absorbância na faixa linear da curva por unidade de tempo ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) é correspondente a variação na taxa de formação do produto de oxidação da siringaldazina. Esses dados de absorbância foram posteriormente aplicados nas Equações 1 e 2 para calcular a atividade enzimática e a atividade específica da lacase.

A equação utilizada considera a mudança de absorbância por unidade de tempo ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) o coeficiente de extinção molar do substrato siringaldazina, e outros fatores como o volume da solução e a concentração de enzima na amostra. Assim, a atividade enzimática determinada para a enzima comercial de *T. versicolor*, nas condições estabelecidas no ensaio, foi de $18,71 \text{ U mL}^{-1}$ (Equação 1). Já a atividade específica foi determinada como sendo de $1,34 \text{ U mg}^{-1}$, conforme a Equação 2, o qual está de acordo com a atividade informada pelo fabricante que é de $1,4 \text{ U mg}^{-1}$.

$$\text{Atividade (U)} = \left(\frac{1,216}{65000 \times 1} \right) \times 10^6 = 18,71 \text{ U mL}^{-1} \quad (1)$$

$$\text{Atividade (U mg}^{-1}\text{)} = \frac{18,71 \text{ U mL}^{-1}}{14 \text{ mg mL}^{-1}} = 1,34 \text{ U mg}^{-1} \quad (2)$$

5.5. Estudos de otimização das condições reacionais para a conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

5.5.1. Efeito da natureza da solução tampão na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Os trabalhos que descrevem a oxidação de álcoois pela lacase de *T. versicolor* auxiliada por mediadores redox demonstram que a enzima possui as melhores atividades em solução tampão como o acetato e citrato, e especialmente nas faixas de pH que vão de 3,5 a 5,5.

Tomando como base as condições experimentais definidas no trabalho de Cheng *et al.*, (2021), foi definido como ponto de partida para a otimização da reação a concentração de 10 g L^{-1} para o glicerol carbonato e um volume total de reação de 5 mL . Desta forma, foram empregados $0,05 \text{ g}$ ($0,42 \text{ mmol}$, 84 mmol L^{-1}) de glicerol carbonato,

0,023 g (0,15 mmol, 30 mmol L⁻¹) do mediador redox TEMPO e 7 mg (9 U) da lacase comercial de *T. versicolor* (7 mg, 9 U). Todos os ensaios de otimização foram realizados em vials selados de 20 mL, do tipo *headspace*, e agitados a 500 rpm e aquecidos a 30 °C, por 24 h, em agitador orbital termostatzado, como mostrado na Figura 25. Para estes ensaios foi estabelecida uma atmosfera rica em oxigênio fornecido por uma bexiga inflável com gás oxigênio e distribuída por meio de um ramal e inserida nos vials através de agulhas.

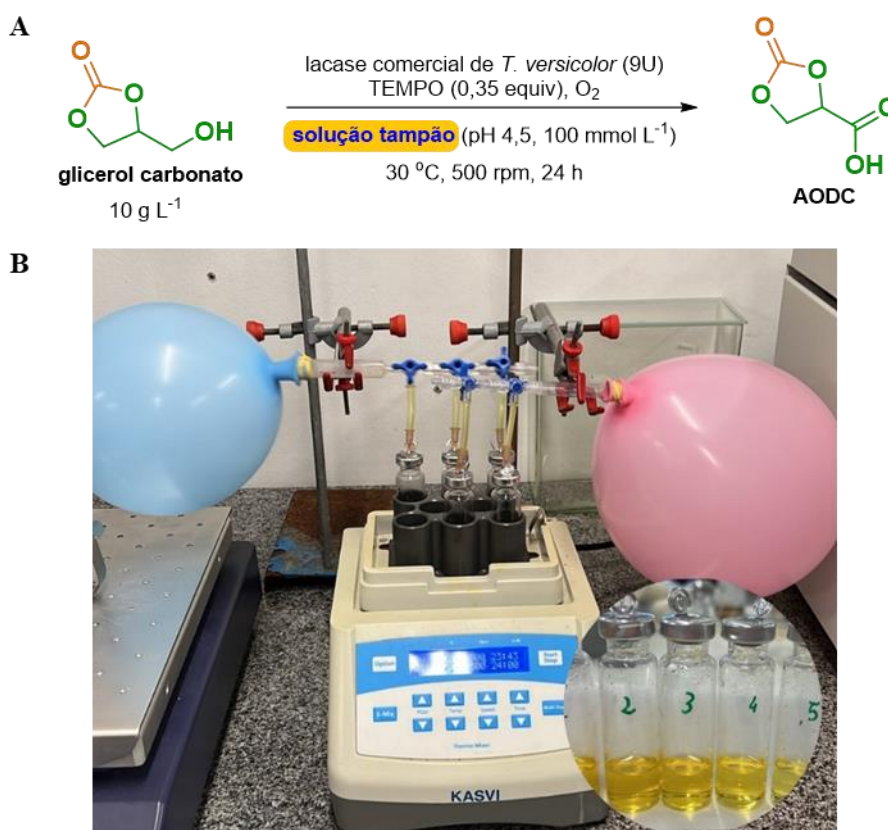


Figura 25. (A) equação química para a reação de conversão do glicerol ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico com as condições estipuladas para avaliação do efeito da solução tampão e, (B) sistema utilizado para o estudo das reações enzimáticas. No detalhe é mostrado os vials com as reações de oxidação biocatalisadas após 24 h.

O gráfico apresentado na Figura 26 mostra os resultados obtidos quando foram avaliados o efeito dos tampões acetato de sódio, citrato de sódio, citrato-fosfato, fosfato de sódio e fosfato de potássio. Todas as soluções tampão foram preparadas na concentração

de 100 mmol L⁻¹ e pH 4,5. Também foi avaliado o efeito de apenas água como meio reacional.

Como pode ser observado, em todos os ensaios houve conversão do glicerol carbonato, sendo que nas condições em que foram empregados os tampões acetato de sódio e citrato de sódio foram observadas as maiores conversões, com 70% e 82%, respectivamente. Nas demais condições, as conversões ficaram entre 36% e 43%. Até mesmo quando apenas água foi utilizada como meio, foi observado o consumo do glicerol carbonado, com 41% de conversão.

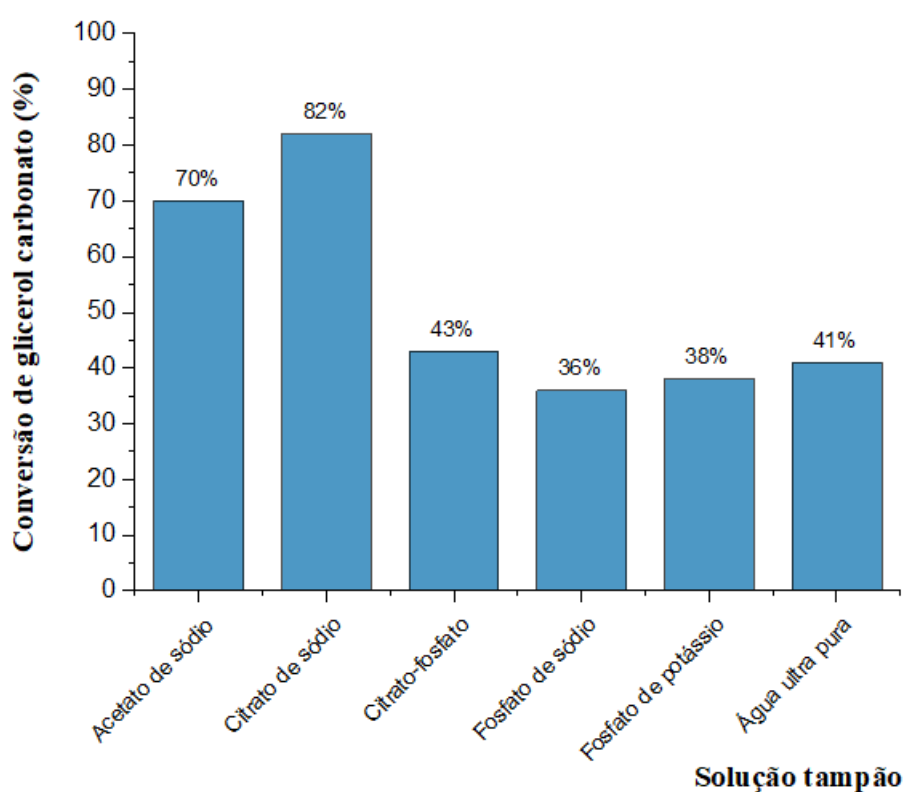


Figura 26. Efeito da natureza da solução tampão na conversão de glicerol carbonato.

Os resultados obtidos no estudo da reação enzimática, utilizando diferentes soluções tampão e água, estão em concordância com a literatura, indicando que as melhores conversões foram alcançadas nas condições com tampão acetato e citrato. Conforme reportado por Liebmingner *et al.* (2009) e por Cheng *et al.* (2021), a oxidação de álcoois mediada por lacase apresentam desempenho superior quando conduzida nesses dois sistemas tampão.

Ao analisar o cromatograma da reação empregando a solução tampão acetato de sódio (Figura 27), observa-se o pico referente ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico, com t_R de 11,1 min, em concordância com o t_R para o produto obtido via síntese não enzimática (Figura 21), e o pico correspondente ao glicerol carbonato que não foi consumido, com t_R de 17,6 min. O pico com t_R de 15,8 min corresponde ao tampão acetato, o qual foi identificado por comparação da análise cromatográfica da solução tampão pura.

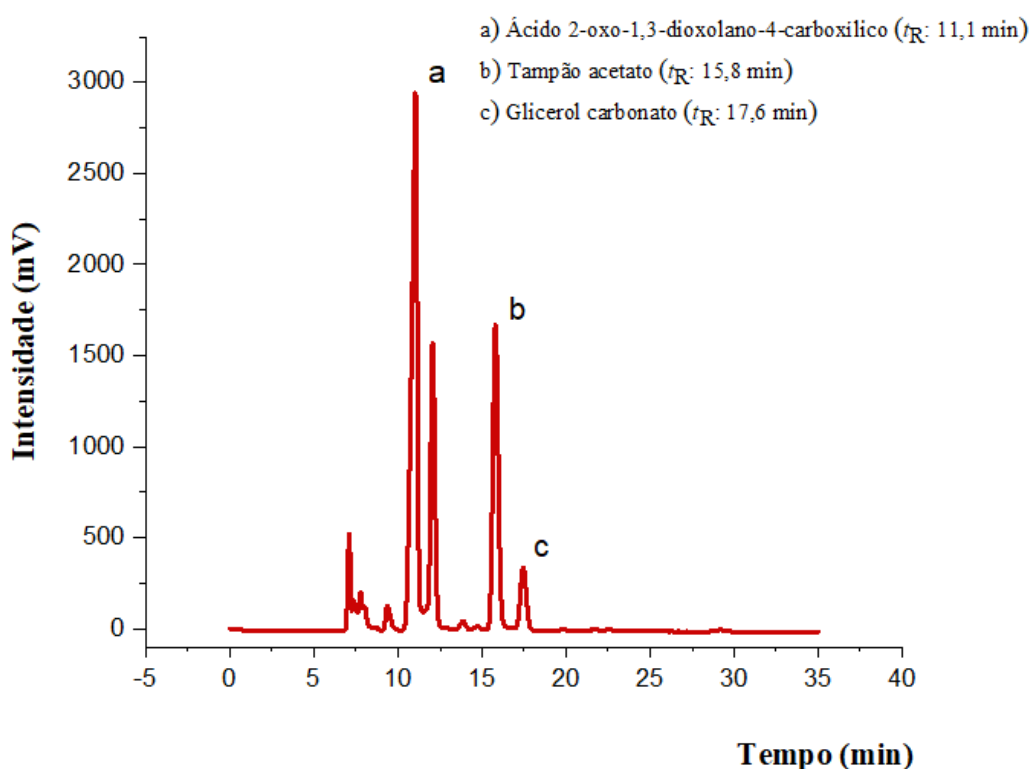


Figura 27. Cromatograma resultante da análise da reação de oxidação quimio-enzimática do glicerol carbonato em solução tampão acetato de sódio (pH 4,5, 100 mmol L⁻¹).

Para a reação conduzida em tampão citrato, a análise cromatográfica mostrada na Figura 28, revela que o pico referente à solução tampão possui t_R de 9,3 min, o qual também foi atribuído por comparação da análise cromatográfica da solução tampão pura. No t_R de 11,1 min observa-se o pico correspondente ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico e por fim o pico da eluição do glicerol carbonato com t_R de 17,6 min.

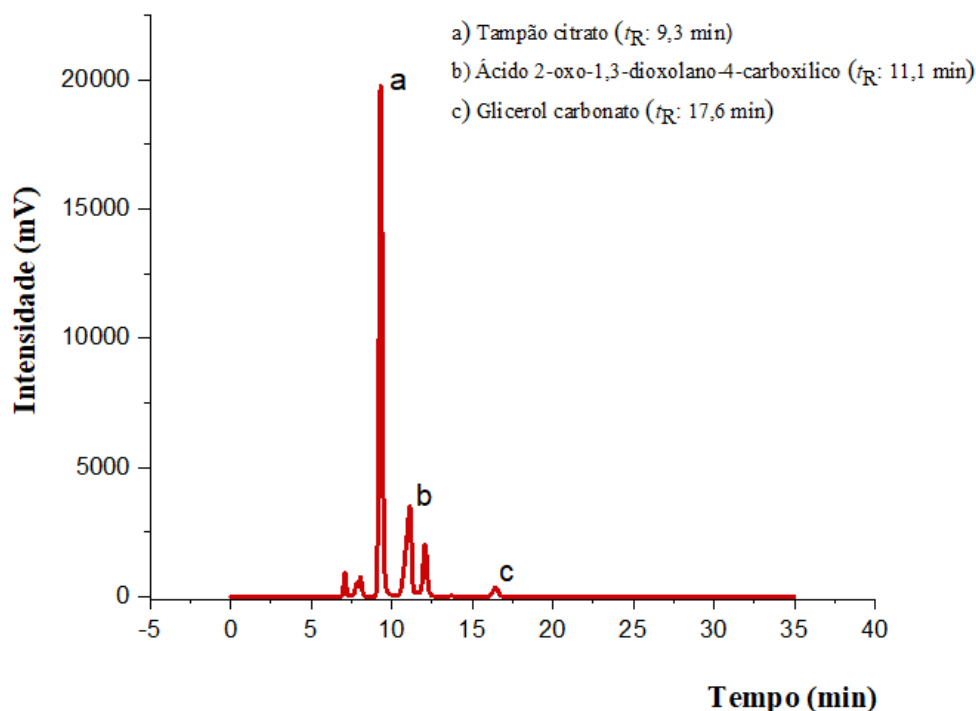


Figura 28. Cromatograma resultante da análise da reação de oxidação quimio-enzimática do glicerol carbonato em solução tampão citrato de sódio (pH 4,5, 100 mmol L⁻¹).

A maior conversão obtida com o tampão citrato vai ao encontro com os resultados encontrados no estudo de Cheng *et al.*, (2021), que avaliaram a conversão do 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF) ao respectivo 2,5-ácido furanodicarboxílico (FDCA) na presença da lacase de *T. versicolor* e TEMPO. Os autores descreveram que o tampão citrato foi o melhor entre os tampões avaliados, alcançando conversões entre 76% e 82%.

A capacidade tamponante do meio reacional é um fator relevante para o sistema, e que certamente exerce papel fundamental na conversão. O produto da reação é um ácido carboxílico que ao ser formado vai promover a redução do pH do meio reacional. Dados na literatura descrevem que a lacase de *T. versicolor* possui maior atividade na faixa de pH entre 3,5 e 5,5. Assim, a regeneração do íon oxoamônio, o qual é essencial para a continuidade do ciclo quimio-enzimático, é afetada. Além disso, de acordo com a discussão feita por Cheng *et al.*, (2021), a solução tampão citrato se destaca não apenas pela manutenção do pH, mas também por favorecer a hidratação do grupo aldeído para conversão ao ácido carboxílico, quando comparada às demais soluções tampão avaliadas.

Com base nos resultados de conversão obtidos entre a solução tampão citrato e a solução tampão acetato, ambas foram utilizadas na continuidade dos estudos de otimização reacional.

5.5.2. Efeito do pH e da concentração da solução tampão acetato na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Embora tenha sido alcançado um valor de conversão maior quando empregado o tampão citrato, o uso do tampão acetato possui vantagens de operacionalização do processo, principalmente quanto as etapas finais de purificação. Desta forma, foram avaliados em triplicata se ajustes no valor de pH e na concentração da solução tampão proporcionariam o aumento da conversão (Figura 29A). Desta forma, inicialmente manteve-se a concentração do tampão acetato em 100 mmol L^{-1} e avaliou-se o efeito do pH, investigando os seguintes valores: 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5. Neste conjunto de ensaios observou-se que a conversão do glicerol carbonato em pH 4,5 foi mantida, com um valor de $71,59\% \pm 1,45$. Ao reduzir o pH para 4,0, observa-se um decréscimo na conversão para $60\% \pm 0,55$. No entanto, quando as reações são conduzidas em valores de pH de 5,0 e 5,5, observou-se um acréscimo na conversão para $81,25\% \pm 0,40$ e $81,64\% \pm 0,13$, respectivamente (Figura 29B). Importante salientar que nestes ensaios não foram observados nas análises cromatográficas nenhum outro sinal além daqueles observados para o produto, tampão acetato e glicerol carbonato.

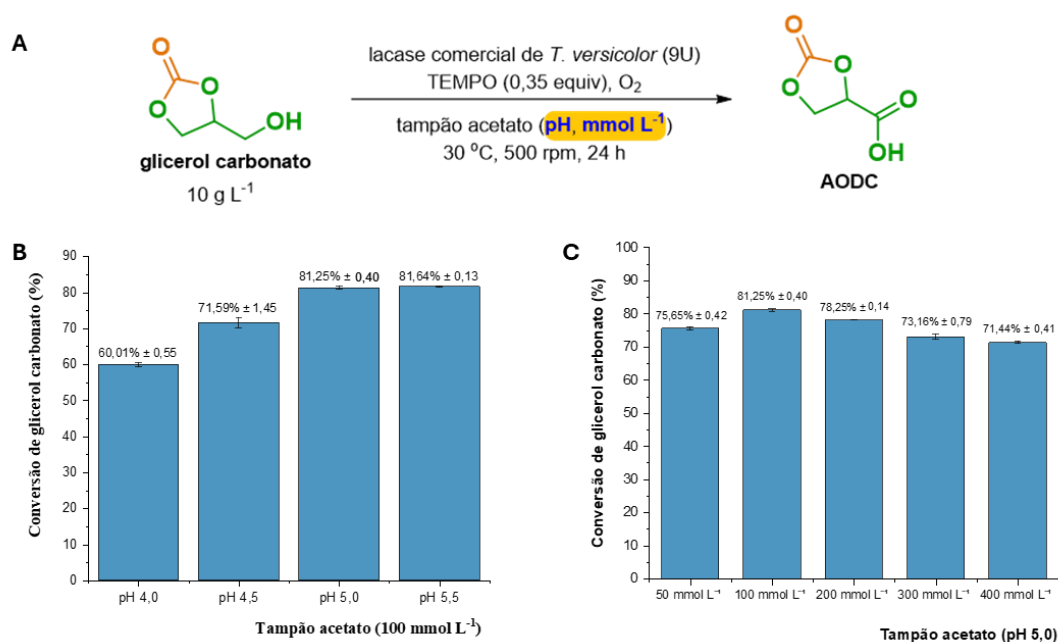


Figura 29. Avaliação do efeito do pH (B) e da concentração (C) do tampão acetato na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.

Considerando que tanto no pH 5,0, quanto no pH 5,5, obteve-se praticamente o mesmo valor de conversão, decidiu-se manter o pH de 5,0 para então avaliar o efeito da concentração do tampão acetato. Além da concentração de 100 mmol L⁻¹, foram avaliadas as concentrações de 50, 200, 300 e 400 mmol L⁻¹. Conforme a Figura 29C, tem-se que a concentração de 100 mmol L⁻¹ foi a que proporcionou o melhor resultado, com 81,25% ± 0,4 de conversão. Resultado esse está de acordo com o resultado obtido no conjunto de ensaios anteriores. Em todas as demais concentrações avaliadas observa-se um decréscimo na conversão para uma faixa entre 71% e 78%.

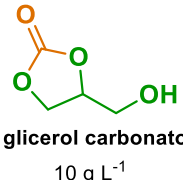
5.5.3. Efeito da concentração de mediador redox e da lacase na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.

Como as tentativas de ajustar o pH e a concentração do pH não levaram a valores acima de 82% na conversão do glicerol carbonato, foram conduzidos novos experimentos com o objetivo de avaliar o efeito da quantidade do TEMPO e da lacase, bem como o tempo de reação.

Como pode ser observado na Tabela 3 (entrada 1), mesmo dobrando a quantidade de lacase de 9 U para 18 U não foi observado incremento na conversão, e sim um pequeno decréscimo para 77,33%. Mantendo as mesmas condições, mas estendendo o tempo reacional para 48 h (entrada 2) também não levou a um aumento da conversão, ficando em 79%. Ao se manter a quantidade de lacase em 9 U e dobrando a quantidade de TEMPO (entradas 3 e 4), foi observado um incremento na conversão apenas quando a reação ocorreu por 48 h, chegando a 87,53%.

Os resultados obtidos com estes experimentos sugerem que há uma limitação no desempenho catalítico sob as condições da reação em solução tampão acetato.

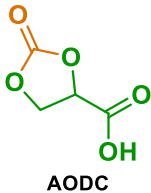
Tabela 3. Efeitos do tempo reacional e das quantidades de lacase e TEMPO na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.



glicerol carbonato
10 g L⁻¹

lacase comercial de *T. versicolor* (U)
TEMPO (equiv), O₂

tampão acetato (pH 5,0, 100 mmol L⁻¹)
30 °C, 500 rpm, 24 h



AODC

Entrada	Tempo (h)	Lacase (U)	TEMPO (mmol L ⁻¹)	Conversão (%)
A*	24	9	30	81,25 ± 0,40
1	24	18	30	77,33 ± 0,00
2	48	18	30	79,00 ± 0,19
3	24	9	60	77,71 ± 0,00
4	48	9	60	87,53 ± 0,07

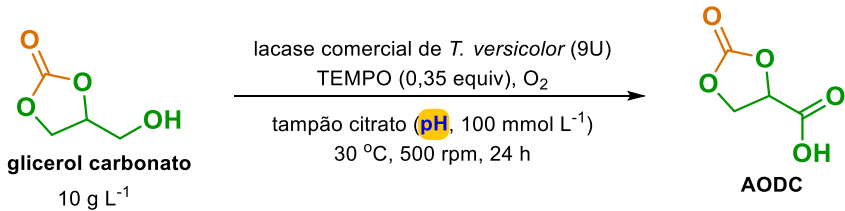
A*: Condições iniciais da síntese enzimática.

5.5.4. Efeito do pH e da concentração da solução tampão citrato na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Diante da conversão de 82,47% obtida com o uso de tampão citrato de sódio, investigou-se a influência do pH e da concentração molar desse tampão na conversão do glicerol carbonato. Inicialmente, mantendo a concentração da solução tampão citrato em 100 mmol L⁻¹, foram avaliados os valores de pH 4,0; 5,0; 5,5 e 6,0.

Como apresentado na Figura 30, ao reduzir o pH para 4,0 observa-se uma queda no valor da conversão para 67,07% ±0,49. No entanto, nos pH de 5,0 e 5,5 a conversão alcança 99%. No cromatograma apresentado na Figura 31, que representa umas das reações realizadas no pH 5,0, não é possível mensurar uma área para o pico referente ao glicerol carbonato dentro do limite de detecção de 0,30 g L⁻¹. Também não foram observados outros picos cromatográficos, o que sugere que a seletividade para o produto se mantém elevada.

As condições reacionais no pH 6,0, não se mostraram favoráveis, e o resultado da conversão foi de 66,35% ±1,44.



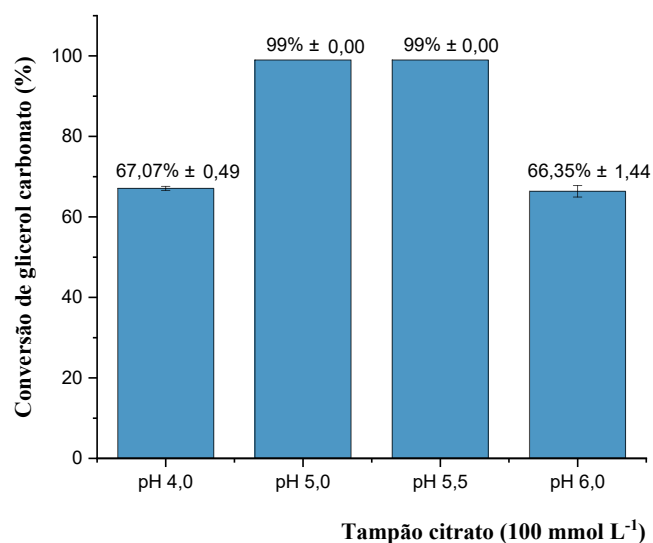


Figura 30. Efeito do pH do meio reacional constituído de tampão citrato de sódio na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico em tampão citrato de sódio.

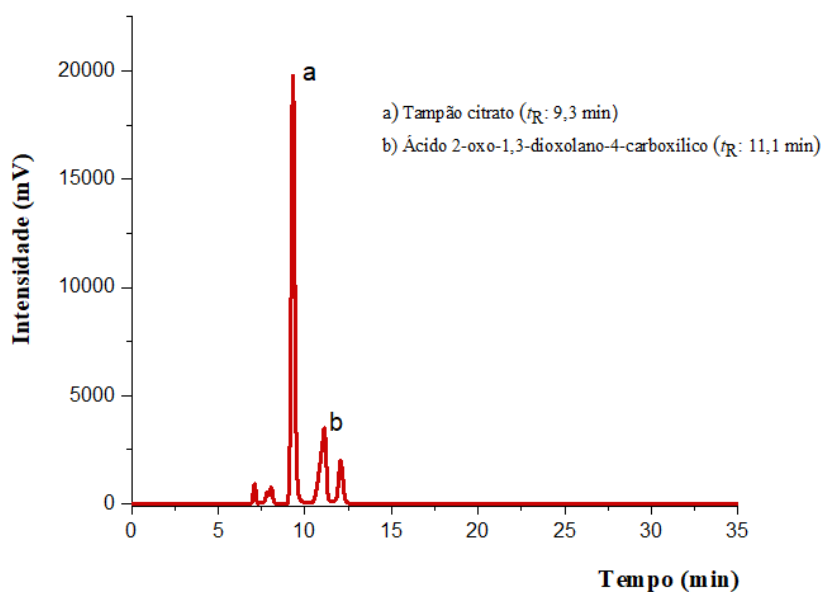


Figura 31. Cromatograma resultante da análise da reação de oxidação quimio-enzimática do glicerol carbonato em solução tampão citrato de sódio (pH 5,0, 100 mmol L⁻¹).

Mesmo que a conversão máxima de 99% tenha sido alcançada, buscou-se entender o efeito da concentração da solução tampão. Para isso, foi estabelecido o pH 5,0 e avaliados as seguintes concentrações: 20, 50, 100, 200, 300 e 400 mmol L⁻¹. Como pode ser observado no gráfico a seguir (Figura 32), a conversão de 99% foi mantida em todas as

concentrações superiores a 100 mmol L⁻¹. Porém, ao reduzir a concentração do tampão para 50 mmol L⁻¹, observou-se um decréscimo na conversão para 89,76%±0,68. Uma redução mais expressiva foi notada ao reduzir a concentração para 20 mmol L⁻¹, sendo alcançada uma conversão de 70,27 % ±1,04.

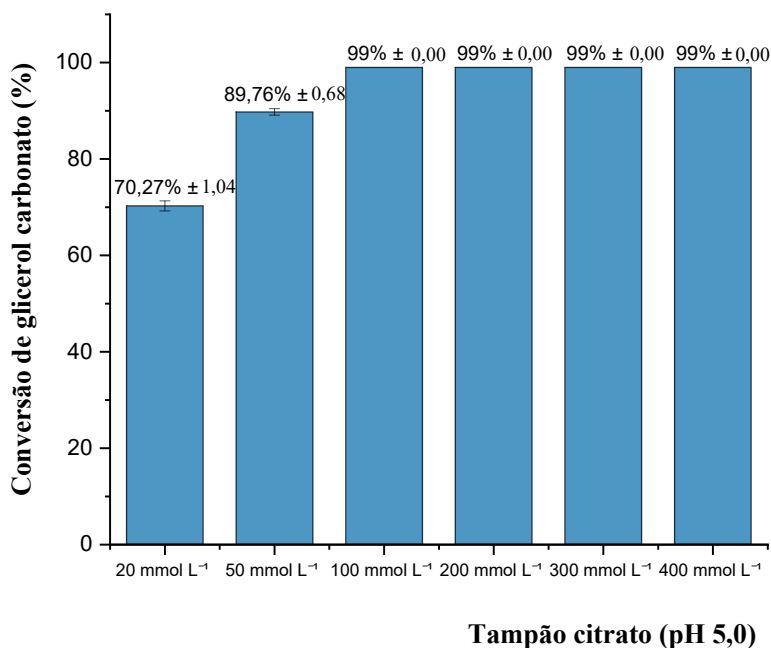


Figura 32. Efeito da concentração da solução tampão citrato de sódio na conversão do glicerol carbonato

Como já foi discutido anteriormente, a solução tampão possui um papel importante nas reações biocatalíticas envolvendo lacases, pois mantem o pH ótimo para a atividade enzimática, o qual para a lacase está entre 3,5 e 5,5. Uma vez que o produto da reação é um ácido carboxílico, a formação deste ácido ao longo da reação tende a reduzir o pH no meio. Uma menor concentração do tampão não permite a manutenção do pH, e desta forma a queda do pH pode reduzir a atividade enzimática, levando a redução da conversão.

5.5.5. Efeito de temperatura na conversão de glicerol carbonato ao longo do período de 24 h

Para compreender o efeito da temperatura reacional no sistema quimio-enzimático e, também, avaliar a conversão ao longo do tempo, propôs-se experimentos que foram conduzidos nas temperaturas de 30°C, 40°C e 50 °C. Aliquotas foram removidas das

reações e tempo pré-determinados para a medida da conversão. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 33.

Quando as reações são conduzidas a 30 °C, o qual foi a temperatura estipulada para todos os ensaios prévios para a otimização, observa-se um aumento gradual na conversão, atingindo o valor máximo de 99% em 24 h. Na temperatura de 40 °C, observa-se que os valores de conversão são bem superiores às reações em 30 °C, nas alíquotas analisadas em 1 h, 3 h, e 6 h, o que sugere uma maior atividade do sistema lacase-TEMPO. No entanto, as alíquotas analisadas com 15 h de reação apresentaram valores de conversão similares às alíquotas analisadas no mesmo período para as reações conduzidas a 30 °C. Porém, os valores da conversão medidos com 15 h são praticamente os mesmos medidos nas alíquotas com 24 h de reação, sendo $89\% \pm 0,1$ o valor máximo de conversão.

Para as reações realizadas a 50 °C, observa-se um perfil similar às reações em 40 °C. Porém, com valores de conversão inferiores, chegando a uma conversão máxima de $72,77\% \pm 0,1$ em 24 h.

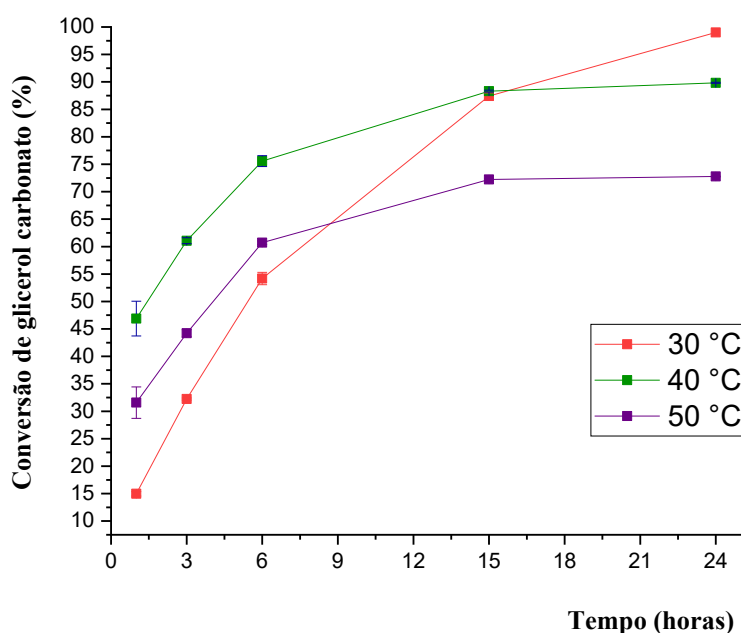


Figura 33. Efeito da temperatura e do tempo na conversão do glicerol carbonato no ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.

De acordo com o estudo de Liebming, Siebenhofer e Guebitz (2009), a oxidação do glicerol utilizando o sistema lacase/TEMPO foi realizada com sucesso à temperatura ambiente (25 °C), resultando em produtos como ácido glicérico, gliceraldeído, ácido

tartrônico e ácido mesoxálico, após 24 horas de reação. Por outro lado, Cheng et al. (2021) demonstraram que, ao utilizar o mesmo sistema lacase/TEMPO em solução tampão citrato a 30 °C, foi possível alcançar alto rendimento na oxidação de hidroximetilfurfural, gerando o ácido 2,5-furanodicarboxílico de forma eficiente. O estudo de Kurniawati; Nicell, (2008) de caracterização de lacase para a transformação de fenol também encontrou boa estabilidade e transformação em condições ácidas e em temperatura de 30 °C e inativação com temperatura de 60 °C, com isto pode-se explicar o resultado encontrado para a conversão de glicerol carbonato, no qual em 24 h a conversão superior a 99% aconteceu em pH 5,0 e 30°C.

5.5.6. Efeito da atmosfera enriquecida de oxigênio na conversão do glicerol carbonato

As lacases utilizam O₂ como como aceptor final de elétrons para regenerar o estado redox e, assim, manter o ciclo catalítico (Lin et al., 2023). Dependendo do sistema reacional, o oxigênio dissolvido no meio é suficiente para manter o ciclo catalítico e converter de forma adequada o substrato. No entanto, em todos os ensaios de otimização até então estudados, foi empregado uma atmosfera enriquecida com O₂. Desta forma, para determinar a necessidade ou não da atmosfera enriquecida, foi realizado um experimento na ausência desta atmosfera. Como resultado, foi medido uma conversação de apenas 32,82%, evidenciado a necessidade da atmosfera enriquecida de O₂ no sistema catalítico em questão (Figura 34).

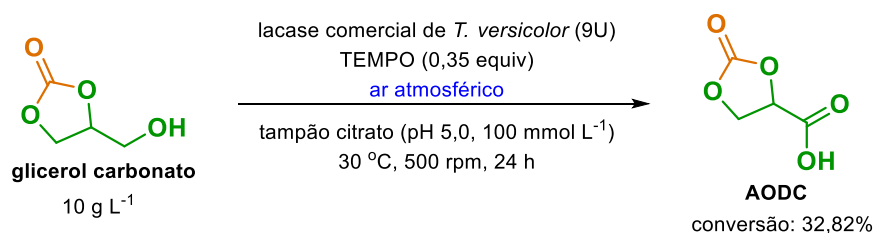
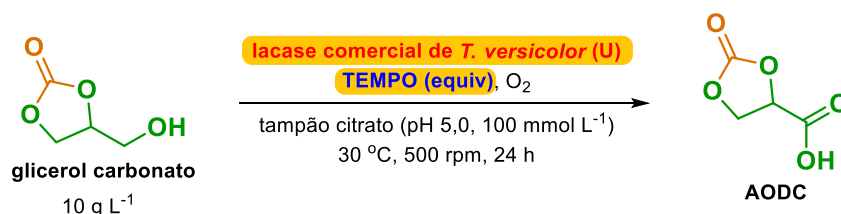


Figura 34. Esquema reacional representado a reação quimio-enzimática de oxidação do glicerol carbonato na ausência de uma atmosfera enriquecida de oxigênio.

5.5.7. Efeito da redução de TEMPO e lacase na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

Embora as condições reacionais estivessem estabelecidas para alcançar a uma excelente conversão de 99%, a redução na quantidade de TEMPO e da lacase são benéficos, uma vez que estes são reagentes que possuem os maiores valores entre todos os que compõem o sistema. Desta forma, avaliou-se o impacto na redução da quantidade destes reagentes. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios ao reduzir tanto a quantidade de TEMPO, como da lacase, como observado na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito da quantidade de lacase e TEMPO na conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.



Entrada	Lacase (U)	TEMPO (mmol L ⁻¹)	Conversão (%)
A*	9	30	99
1	9	15	80
2	9	7,5	56
3	6	30	84
4	4	30	79

A*: Condições iniciais da síntese quimio-enzimática.

Quando a concentração do TEMPO foi reduzida de 30 mmol L⁻¹ para 15 mmol L⁻¹ (Tabela 4, entrada 1), observa-se já uma redução na conversão, atingindo 80% no período de 24 h. Uma redução maior de TEMPO, para um quarto da concentração inicial, impacta mais ainda a conversão, chegando a apenas 56% nas 24 h (entrada 2).

Já nos experimentos em que foi mantida a quantidade inicial de TEMPO e reduzida a quantidade de lacase (entradas 3 e 4), observa-se que o impacto na conversão não é tão expressivo. Quando 6 U de lacase foram empregadas, a conversão atingiu 84% nas 24 h. Já quando a quantidade foi reduzida para 4 U, a conversão chegou a 79%.

O TEMPO apresenta um papel relevante na etapa de oxidação do álcool, e posteriormente do aldeído formado como intermediário, ao correspondente ácido carboxílico. No mecanismo do ciclo catalítico fica evidente que o TEMPO atua como um

intermediário essencial, transferindo elétrons entre a enzima e o substrato, viabilizando a oxidação eficiente do álcool, uma vez que a lacase, por si só, não possui capacidade direta para oxidar álcoois primários na ausência de um mediador apropriado (Marino et al., 2022).

5.6. Escalonamento da síntese e purificação do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

A partir dos estudos de otimização, o próximo passo foi conduzir a reação em uma escala maior com a finalidade de isolar o produto desejado, o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico, e assim obter quantidade suficiente para determinar o rendimento e prosseguir com as caracterizações estruturais.

Para isso, foi realizada uma reação em uma escala de 10 vezes, mantendo as concentrações dos reagentes. A reação foi realizada em frasco de fundo redondo, com agitação magnética, e aquecimento por meio de um banho seco com temperatura controlada, como pode ser visto na imagem do sistema mostrada na Figura 35. O gás oxigênio foi fornecido por uma bexiga inflável conectada diretamente ao frasco por meio de e uma agulha, garantindo assim uma atmosfera enriquecida com O₂.

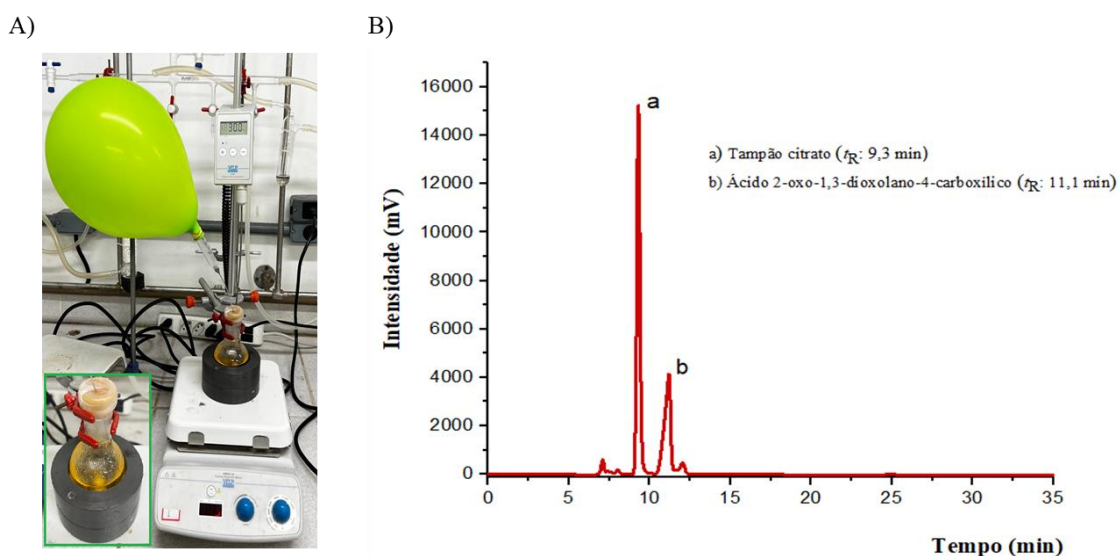


Figura 35. (A) Sistema reacional utilizado para o escalonamento da reação enzimática e (B) cromatograma da análise de uma alíquota da reação após 24 h.

O aumento de escala não impactou negativamente o desempenho da reação, sendo possível observar a manutenção tanto da conversão do glicerol carbonato quanto da seletividade do processo, mesmo após 24 horas de reação, obtendo-se a conversão superior a 99% como pode ser observado no cromatograma na Figura 35B.

Esse resultado evidencia a robustez do sistema enzimático empregado, bem como a viabilidade da aplicação desse protocolo em processos em escala maior, sem prejuízo na eficiência da biocatálise.

Quanto à recuperação e purificação do produto desejado do meio reacional, encarou-se os desafios relacionados à alta solubilidade do produto em água. Além disso, o ácido cítrico e os respectivos sais possuem também alta solubilidade em água, o que torna difícil a separação. Algumas tentativas de recuperar o produto foram realizadas, entre elas a extração com solventes orgânicos e imiscíveis em água. Tanto o uso de acetato de etila, como clorofórmio, não resultaram em extrações efetivas. Em uma outra tentativa, foi removida toda a água sob pressão reduzida, e o resíduo remanescente foi solubilizado em metanol. A esta solução foi adicionado cloreto de cálcio (CaCl_2) com o intuito de que o cátion cálcio formasse um complexo com o citrato, e menos solúvel no meio. De fato, a análise por RMN de ^1H mostrou que a quantidade relativa de citrato da amostra foi menor que nas amostras sem nenhuma purificação.

A purificação por cromatografia em coluna de sílica mostrou-se bastante eficiente ao ser empregado como eluente uma mistura de metanol em clorofórmio (10% v/v), sendo a eluição acompanhada por cromatografia em camada delgada. No entanto, o uso do clorofórmio para a purificação do produto não está estritamente alinhado com o emprego da biocatálise como um processo com menor impacto ambiental em síntese química. Desta forma, foi avaliado a purificação por cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente os solventes etanol e acetato de etila, o qual também se mostrou bastante eficiente em separar o produto dos componentes presentes no tampão. Para uma rápida purificação utilizando uma coluna de sílica curta, com características de filtração, o TEMPO foi previamente removido do meio reacional por extração com cicloexano. Posteriormente a água foi removida sob pressão reduzida, e o resíduo submetido a cromatografia em coluna de sílica, utilizando como eluente uma mistura de etanol e acetato de etila. Pela relativa pureza da amostra bruta, e sendo que a maior impureza está relacionada à presença do ácido cítrico e dos respectivos sais, a coluna cromatográfica foi realizada com o intuito de uma filtração. Em um primeiro momento foi empregado como eluente 20% de etanol em acetato

de etila para remoção de qualquer resíduo de glicerol carbonato ou TEMPO. Em seguida, foi utilizada uma mistura contendo 60% de etanol em acetato de etila, havendo assim a eluição do produto. Nestas condições de purificação, o produto foi isolado com um rendimento de 66% (0,368 g).

O cromatograma mostrado na Figura 36, é referente a análise do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico após o processo de purificação em que é observado apenas o pico com t_R de 11,1 min, que já foi atribuído ao produto.

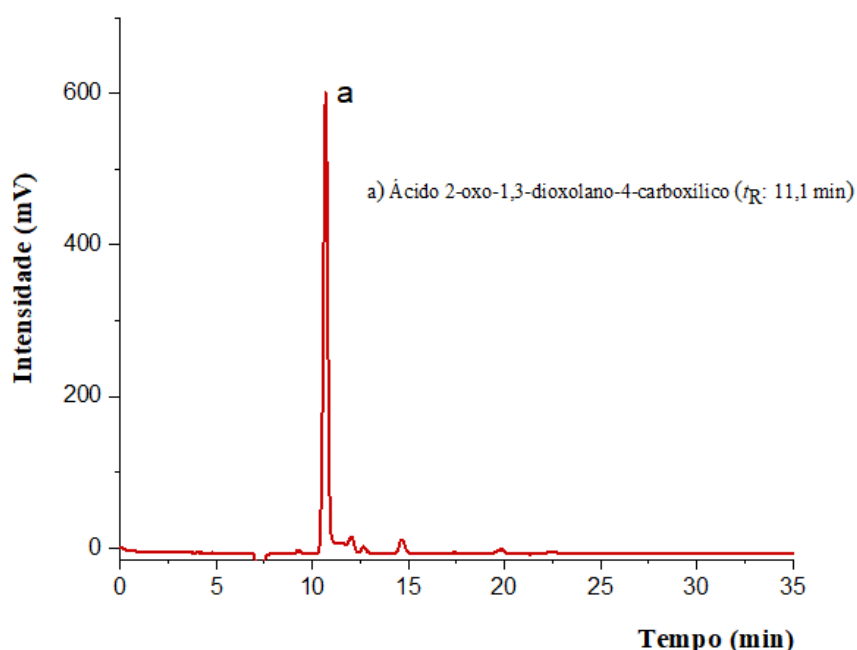


Figura 36. Cromatograma do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico após o processo de purificação.

5.7. Caracterização estrutural do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico

O produto purificado foi então analisado por RMN de ^1H (Figura 37), utilizando água deuterada (D_2O) como solvente. O ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico possui um centro de quiralidade no carbono vizinho ao grupo ácido carboxílico. Desta forma, os hidrogênios vizinhos ao centro de quiralidade são diaterotópicos, e desta forma magneticamente não equivalentes, gerando sinais distintos no espectro. Ao todo são esperados 4 sinais no espectro de RMN de ^1H , com integrais relativas de 1 hidrogênio para cada sinal.

Observando o espectro para o ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico, observa-se apenas 3 sinais. O sinal referente ao ácido carboxílico, não está presente uma vez que é

facilmente dissociado, trocando rapidamente com o deutério do solvente. Em $\delta = 5,08$ ppm, encontra-se um sinal na forma de dupletos, com integral relativa para um hidrogênio (1H), que foi atribuído ao hidrogênio H_a . O H_a apresenta a constante de acoplamento geminal $^2J_{H_a-H_a'}$ de 9,37 Hz e a constante de acoplamento vicinal $^3J_{H_a-H_b}$ de 6,43 Hz. Já no $\delta = 4,76$ ppm, próximo ao sinal da água residual em $\delta = 4,79$ ppm, encontra-se o sinal atribuído ao $H_{a'}$, também com integral relativa para 1H, e constantes de acoplamento geminal $^2J_{H_{a'}-H_a}$ de 9,37 Hz e constante de acoplamento vicinal $^3J_{H_{a'}-H_b}$ de 8,56 Hz. Por fim, o sinal em $\delta = 4,45$ ppm, foi atribuído ao hidrogênio H_b , com integral relativa para 1H. Neste sinal, observa-se as constantes de acoplamento vicinais $^3J_{H_b-H_{a'}}$ de 8,56 Hz e a constante $^3J_{H_b-H_a}$ de 6,43 Hz.

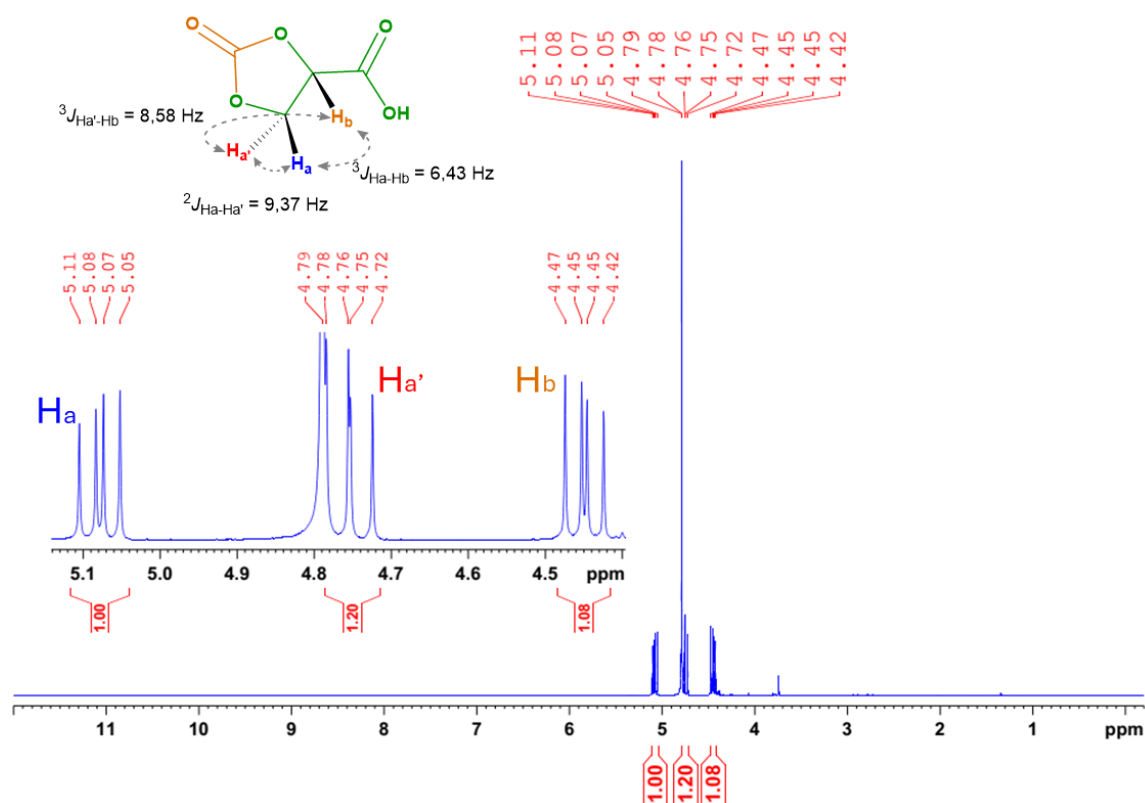


Figura 37. Espectro de RMN de 1H (300 MHz, D_2O) do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.

Já no espectro de RMN de ^{13}C apresentado na Figura 38, observa-se os quatro sinais esperados, sendo o sinal em $\delta = 172,4$ atribuído ao carbono do grupo ácido carboxílico, o sinal em $\delta = 157,5$ ppm atribuído ao carbono do grupo carbonato. O sinal em $\delta = 74,3$ é

atribuído ao carbono do centro de quiralidade, e por fim, o sinal em $\delta = 68,9$ ppm atribuído ao carbono do grupo CH_2

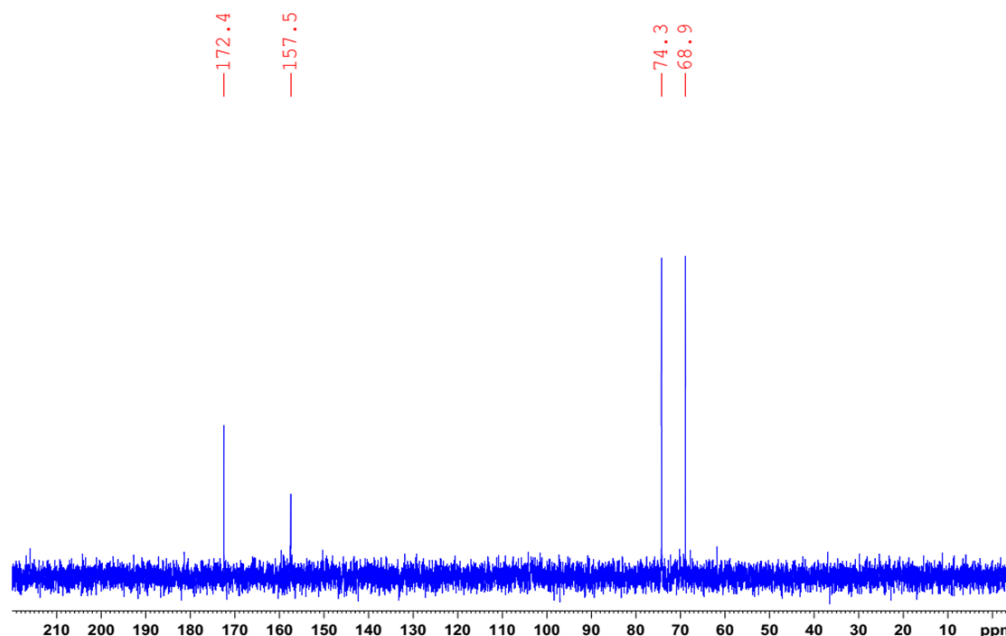


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C (75,4 MHz, D_2O) do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.

As atribuições dos sinais em $\delta = 74,3$ ppm e $\delta = 68,9$ ppm pode ser confirmada com experimento de RMN de $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -APT (*Attached Proton Test*). No experimento APT, os sinais para os carbonos dos grupos metino (CH) e metila (CH_3) são mostrados na fase positiva, enquanto os carbonos quartenários (C) e carbonos dos grupos metilenos (CH_2) são mostrados na fase negativa.

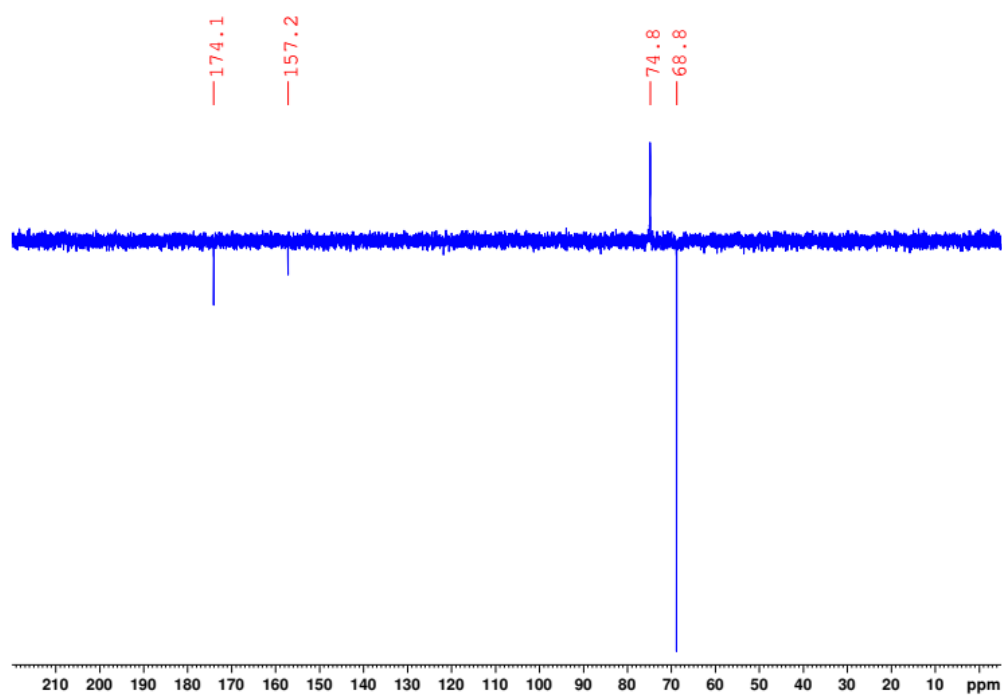


Figura 39. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -APT (75,4 MHz, D_2O) do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi proposta e desenvolvida um método biocatalítico para a síntese do ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico, a partir da oxidação enzimática do glicerol carbonato empregando o sistema lacase – mediador redox.

A partir dos estudos de otimização para sistema quimio-enzimático, foi possível determinar as condições mais favoráveis para a conversão do glicerol carbonato ao ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico mediada pela lacase comercial de *T. versicolor* como biocatalisador e TEMPO como mediador redox, em um meio constituído de uma solução aquosa de tampão de citrato de sódio e sob atmosfera enriquecida com oxigênio.

Nas condições otimizadas, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou a conversão completa do glicerol carbonato ao respectivo ácido. O isolamento do produto no meio reacional se mostrou um desafio pela alta afinidade com a água, assim como os componentes da solução tampão. O ácido 2-oxo-1,3-dioxolano-4-carboxílico foi obtido na sua forma isolada com 66% de rendimento.

Os resultados obtidos com este trabalho reforçam a viabilidade do uso de lacases como biocatalisadores promissores em reações de oxidação seletiva, especialmente na síntese de compostos de alto valor agregado a partir de fontes renováveis.

Adicionalmente, a utilização de lacases destaca-se por seu caráter sustentável, operando sob condições brandas e dispensando o uso de oxidantes químicos agressivos. Essa característica posiciona a metodologia em conformidade com os princípios da química verde, contribuindo para o avanço de rotas sintéticas mais sustentáveis.

Conclui-se, a partir dos resultados obtidos pelo presente trabalho, que a utilização da catálise enzimática para a obtenção do ácido 2-oxo-1,3-dioxoladnoo-4-carboxílico por meio do sistema redox lacase/TEMPO demonstra-se como uma metodologia de alta eficiência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Ghanayem, A.A., Joseph, B., 2020. Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2871–2882. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10429-x>
- ANASTAS, Paul T.; WARNER, John C. *Green chemistry: theory and practice*. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- Bassanini, I., Ferrandi, E.E., Riva, S., Monti, D., 2021. Biocatalysis with laccases: An updated overview. *Catalysts* 11, 1–30. <https://doi.org/10.3390/catal11010026>
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS Lett.* 267, 99–102. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80298-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-w)
- Cheng, A. Di, Zong, M.H., Lu, G.H., Li, N., 2021. Solvent-Promoted Oxidation of Aromatic Alcohols/Aldehydes to Carboxylic Acids by a Laccase-TEMPO System: Efficient Access to 2,5-Furandicarboxylic Acid and 5-Methyl-2-Pyrazinecarboxylic Acid. *Adv. Sustain. Syst.* 5, 1–8. <https://doi.org/10.1002/adsu.202000297>
- Dakin, H.D., 1903. The hydrolysis of optically inactive esters by means of enzymes. *J. Physiol.* 30, 253–263. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000992>
- De Luca, L., Giacomelli, G., Masala, S., Porcheddu, A., 2003. Trichloroisocyanuric/TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions: A close investigation. *J. Org. Chem.* 68, 4999–5001. <https://doi.org/10.1021/jo034276b>
- Galletti, G., Prete, P., Vanzini, S., Cucciniello, R., Fasolini, A., De Maron, J., Cavani, F., Tabanelli, T., 2022. Glycerol Carbonate as a Versatile Alkylating Agent for the Synthesis of β -Aryloxy Alcohols. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 10, 10922–10933. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c02795>
- Galletti, P., Pori, M., Funicello, F., Soldati, R., Ballardini, A., Giacomini, D., 2014. Laccase-Mediator System for Alcohol Oxidation to Carbonyls or Carboxylic Acids: Toward a Sustainable Synthesis of Profens. *ChemSusChem* 7, 2684–2689. <https://doi.org/10.1002/cssc.201402136>
- Gu, N.Y., Ao, H., Pei, J.J., 2012. Preparation and characterization of composite polymer electrolytes containing surface-modified nano silica. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical J. Chinese Univ.* 33, 1295–1300.

<https://doi.org/10.3969/j.issn.0251-0790.2012.06.029>

HIRANO, J. ichiro; MIYAMOTO, K.; OHTA, H. The green and effective oxidation of alcohols to carboxylic acids with molecular oxygen via biocatalytic reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 49, n. 7, p. 1217–1219, 2008.

Inrirai, P., Keogh, J., Centeno-Pedrazo, A., Artioli, N., Manyar, H., 2024. Recent advances in processes and catalysts for glycerol carbonate production via direct and indirect use of CO₂. *J. CO₂ Util.* 80, 102693.

<https://doi.org/10.1016/j.jcou.2024.102693>

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. *Rev. 09*, Rio de Janeiro, jun. 2020, 30 p. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio Acesso em: 08 de jul. 2024.

Jitjamnong, J., Khongprom, P., Ratanawilai, T., Ratanawilai, S., 2023. Techno-economic analysis of glycerol carbonate production by glycerolysis of crude glycerol and urea with multi-functional reactive distillation. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 8, 100465. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2023.100465>

Kaur, A., Ali, A., 2020. Lithium Zirconate as a Selective and Cost-Effective Mixed Metal Oxide Catalyst for Glycerol Carbonate Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 59, 2667–2679. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b05747>

Kurniawati, S., Nicell, J.A., 2008. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresour. Technol.* 99, 7825–7834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.084>

Li, W., Chen, S., Lu, Y., Yu, J., Zhao, S., 2024. Co-immobilization of laccase-mediator system to catalyze the synthesis of theaflavins from tea polyphenols. *Results Eng.* 22, 102062. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102062>

Liebming, S., Siebenhofer, M., Guebitz, G., 2009. Oxidation of glycerol by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in the presence of laccase. *Bioresour. Technol.* 100, 4541–4545. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.051>

Lin, H., Yu, Z., Wang, Q., Liu, Y., Jiang, L., Xu, C., Xian, M., 2023. Application of Laccase Catalysis in Bond Formation and Breakage: A Review. *Catalysts* 13.

<https://doi.org/10.3390/catal13040750>

- Mani, P., Kumar, V.T.F., Keshavarz, T., Sainathan Chandra, T., Kyazze, G., 2018. The role of natural laccase redox mediators in simultaneous dye decolorization and power production in microbial fuel cells. *Energies* 11, 1–12.
<https://doi.org/10.3390/en11123455>
- Marino, I., Pignataro, E., Danzi, D., Cellini, F., Cardellicchio, C., Biundo, A., Pisano, I., Capozzi, M.A.M., 2022. A comparative screening of laccase-mediator systems by white-rot fungi laccases for biocatalytic benzyl alcohol oxidation. *Sci. Rep.* 12, 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-24839-6>
- Morita, T., Assumpção, R.M.V., 2007. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*, 2nd ed. Editora Edgar Blucher, São Paulo.
- Ochoa-Gómez, J., Gómez-Jiménez-Aberasturi, O., Ramírez-López, C., Belsué, M., 2012. A brief review on industrial alternatives for the manufacturing of glycerol carbonate. *a Green Chem.* 16, 389–399.
- Pattanaik, P.P., Kumar, P.M., Raju, N., Lingaiah, N., 2021. Continuous Synthesis of Glycerol Carbonate by Transesterification of Glycerol with Dimethyl Carbonate Over Fe–La Mixed Oxide Catalysts. *Catal. Letters* 151, 1433–1443.
<https://doi.org/10.1007/s10562-020-03397-4>
- Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T., 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277, 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>
- Sheldon, R.A., 2024. Green chemistry and biocatalysis: Engineering a sustainable future. *Catal. Today* 431, 114571. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2024.114571>
- Sym, E.A., 1936. Action of esterase in the presence of organic solvents. *Biochem. J.* 30, 609–617. <https://doi.org/10.1042/bj0300609>
- Tang, P., Zheng, T., Yang, C., Li, G., 2022. Enhanced physicochemical and functional properties of collagen films cross-linked with laccase oxidized phenolic acids for active edible food packaging. *Food Chem.* 393, 133353.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133353>
- Tromp, S.A., Matijošyte, I., Sheldon, R.A., Arends, I.W.C.E., Mul, G., Kreutzer, M.T.,

- Moulijn, J.A., De Vries, S., 2010. Mechanism of Laccase-TEMPO-Catalyzed Oxidation of Benzyl Alcohol. *ChemCatChem* 2, 827–833.
<https://doi.org/10.1002/cctc.201000068>
- Wisniak, J., 2014. Gabriel Bertrand. *Rev. CENIC. Ciencias Biológicas* 45, 230–245.
- Wölfle, H., Walther, B., Putzien, S., 2015. 2-oxo-1,3-dioxolane-4-carboxamine building block, their preparation and use. US2025/0353521A1.
- Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J.C., Baldenius, K., Bornscheuer, U.T., 2021. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 60, 88–119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc. Trans.* 43, 472–486.
- ZHDANKIN, Viktor V.; KO POSOV, Alexey Y.; LITVINOV, Dmitry N.; FERGUSON, Michael J.; McDONALD, Robert; LUU, Thanh; TYKWI NSKI, Rik R. Esters of 2-iodoxybenzoic acid: hypervalent iodine oxidizing reagents with a pseudobenziodoxole structure. *The Journal of Organic Chemistry*, Easton, v. 70, n. 16, p. 6484–6491, 2005. DOI: 10.1021/jo051010r
- Zorzanelli, B.C., Muri, E.M.F., 2015. Green oxidation of alcohols. *Rev. Virtual Quim.* 7, 663–683. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150029>