

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 24/09/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Alex Henrique Miller

Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases:
aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol

São José do Rio Preto

2020

Alex Henrique Miller

Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases:

aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP – Proc. 2016/24303-0 e 2018/21483-3

CNPq – Proc. 141956/2016-0

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto

2020

M647n Miller, Alex Henrique
Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases : aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol / Alex Henrique Miller. -- São José do Rio Preto, 2020
187 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: José Geraldo Nery

1. Oxidação. 2. Ressonância paramagnética eletrônica. 3. Lacase. 4. Nanopartículas. 5. Eletroquímica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Alex Henrique Miller

Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases:

aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadoras: FAPESP – Proc. 2016/24303-0 e 2018/21483-3

CNPq – Proc. 141956/2016-0

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/SP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho
USP – Câmpus de Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. Alistair John Fielding
LJMU – City Campus – Liverpool/United Kingdom

São José do Rio Preto

24 de setembro de 2020

Dedico este trabalho a minha mãe **Marlene** (*in memoriam*), a meu pai **Orival**, a minhas irmãs e aos meus sobrinhos e sobrinhas. Vocês sempre deram o amor e suporte que eu precisava para seguir firme nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por tudo que fizeram por mim a vida toda. Deram-me tudo, mesmo quando não tinham nada. Sou grato pela educação, pelos valores ensinados e, principalmente, por terem plantado a semente da luta em mim e ensinado que as batalhas sempre virão, cabe a mim enfrentá-las.

Às minhas irmãs – Silvia, Solange, Simoni, Suze e Idamarcia – e aos meus sobrinhos, por serem a melhor família que eu poderia ter, e estarem sempre ao meu lado.

À Solange pelos anos de convivência, e por toda ajuda dada desde o início da amizade.

Ao Miza e ao João, por terem feito parte da minha vida acadêmica e pessoal durante estes anos de doutorado, e se tornado grandes amigos, para a vida toda.

Ao Oscar e a Angela, por terem sido sempre grades companheiros, em casa, na faculdade e na vida em geral.

Aos meus grandes amigos Janine, Carolina, Ingrid e Fernando, companheiros desde a Graduação até essa viagem selvagem pela Pós-Graduação. *The last of us will last forever!*

Aos amigos do vôlei Ibilce e vôlei Montanhês, pelas muitas horas de lazer e diversão.

To all the friends that have crossed my pathway in 2019 – during my internship in Liverpool/UK –, specially to Leandro, Tasson, Jake, Dominik, Patryk, Bel and Llew. It was such a year! You have definitely made my stay there memorable, and I am certain that our friendship will be for life.

To all LJMU's and The Manchester University's research fellows and staff – specially to Professor Fyaz, and lab technicians Nicola, Rob and Adam –, for the help provided, for the precious inputs on scientific work, and of course, for the laughs and drinks during PUB's time.

To my advisor abroad, Dr. Alistair J. Fielding. First of all, for accepting a strange in his research group. I am pleased to acknowledge all your work towards my research project. I

guess we've both learnt from each other, but I have certainly learnt more. I am sincerely thankful!

Aos professores e técnicos do Departamento de Física, pelos ensinamentos em disciplinas e apoio técnico geral.

Aos meus companheiros de pesquisa no LACET, pelo companheirismo e por toda a ajuda dada em caráter profissional e não profissional ao decorrer deste Doutorado.

À Profa. Dra. Eleni Gomes e alunos/pesquisadores do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – especialmente à Dra. Ana Lucia Ferrarezi – pela ajuda e recursos materiais fornecidos nos estudos em colaboração.

Aos Professores Marcelo de Freitas Lima e Maurício Boscolo pelas colaborações e por cederem espaço e tempo em seus respectivos laboratórios para coleta de dados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Geraldo Nery, por todo o trabalho dedicado ao desenvolvimento dos projetos de pesquisa, desde a Iniciação

Científica até o Doutorado. Agradeço pela colaboração e empenho, no geral, mas principalmente por todas as discussões científicas relevantes, que contribuíram e continuarão contribuindo no meu enriquecimento intelectual e profissional. Sou sinceramente agradecido!

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento aos meses iniciais de desenvolvimento deste projeto, através de concessão de bolsa de doutorado, processo nº 141956/2016-0.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa de doutorado regular no país, sob o processo nº 2016/24303-0, e da bolsa estágio de pesquisa no exterior, sob o processo nº 2018/21483-3.

Once you've accepted your flaws, no one can use them against you.

G.R.R. Martin (2002)¹

RESUMO

A oxidação do glicerol tem sido objeto de diversos estudos no mundo todo; em geral, o principal objetivo destes trabalhos é o encontro de um catalisador apropriado para converter, seletivamente, esta molécula bloco em produtos de alto valor agregado. Lacases imobilizadas em suportes sólidos são catalisadores heterogêneos não prejudiciais ao meio ambiente, que podem ser aplicados para a oxidação do glicerol num sistema lacase-mediador. Estas enzimas contêm átomos de cobre em sua estrutura e catalisam a oxidação de muitos compostos fenólicos com a concomitante redução de água a oxigênio molecular. Apesar da sua especificidade, quando apropriadamente combinada com mediadores, as lacases podem também agir na oxidação de compostos não fenólicos. Este trabalho abordou a síntese e caracterização de zeólitas em nano escala – morfologias FAU, BEA, LTA e MFI –, a aplicação destes materiais como suporte para a imobilização de diferentes lacases comerciais – dos organismos *A. bisporus*, *Aspergillus* sp. e *P. ostreatus* –, e o uso dos complexos obtidos para oxidação do glicerol mediada pelo composto *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO). Todas as zeólitas foram sintetizadas de acordo com a literatura, e a forma sódica da zeólita FAU modificadas por troca iônica com Cu^{2+} para geração de um suporte extra. Os materiais sintetizados foram amino-funcionalizados para permitir a imobilização das lacases covalentemente. Os suportes foram caracterizados por XRD, SEM-EDX, HRTEM, FTIR, e as enzimas livres ou complexos espectroscopicamente avaliados através da oxidação do composto 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). Com base nas atividades de oxidação do composto ABTS, os complexos FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp, e BEAc/APTMS/GA/LAsp foram selecionados para aplicação nas reações de oxidação do glicerol. Para comparação, as enzimas LPO, LAB e LAsp na forma livre e os suportes FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA foram aplicadas em condições reacionais similares. Todas as reações utilizando os complexos lacase/nanozeólitas apresentaram, após 48 h de reação, baixa conversão do glicerol – inferiores a 5%. No entanto, uma alta seletividade foi observada para gliceraldeído, acima de 88 % em todos os casos. Não houve conversão do glicerol utilizando apenas os suportes sem enzima. Por outro lado, quando as enzimas LPO e LAsp foram aplicadas nas suas formas livres, as conversões do glicerol obtidas foram significativamente superiores em comparação aos complexos – ~29% para a LAsp e mais de 80% para a LPO após 48 h de reação. Seletividades de 57,10% a gliceraldeído e 25,75% a ácido glicérico, foram quantificadas das reações com a enzimas livre LPO, enquanto da reação com LAsp, a seletividade a gliceraldeído foi de 78%, e o segundo produto mais obtido

foi ácido glioxílico, 11,47%. A lacase LAB na forma livre apresentou conversão muito menor quando comparada as demais – ~3,2% após 48 h. Visando compreender quais razões levaram a redução da atividade enzimática após imobilização nos materiais nanozeolíticos, um estudo sistemático utilizando voltametria cíclica foi empregado para a LAsp. Este estudo apontou que o potencial de redução desta enzima é um fator limitante na sua aplicação, e que em meio ácido, a taxa de oxidação do mediador TEMPO é bastante reduzida. Com o uso de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), foi possível inferir que a imobilização enzimática causou distorções estruturais na LAsp, em específico, nos centros de cobre do seu sítio catalítico, pois variações significativas nos Hamiltonianos de spin (tensores g , e constantes de acoplamento hiperfino A) foram observadas quando comparadas enzimas em solução ou imobilizadas. Os espectros revelaram também uma alta dependência da acidez do meio na interação dos sítios de cobre com os ligantes de coordenação. Além disso, os Hamiltonianos de spin paralelos do cobre T2 da enzima imobilizada em zeólita BEAc/APTMS/GA ($g_{\parallel} = 2,275$, $A_{\parallel} = 173,4 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) são mais próximos da enzima livre em pH 7 ($g_{\parallel} = 2,275$, $A_{\parallel} = 170,1 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) do que em pH 4 ($g_{\parallel} = 2,275$, $A_{\parallel} = 220,2 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$). Isso indica que o pH dos microambientes enzimáticos após imobilização é neutro, e isso é a provável razão pela redução na atividade enzimática após imobilização nos suportes zeolíticos.

Palavras-chave: Glicerol. Lacase. Nanozeólita. Imobilização. Oxidação. Voltametria Cíclica. EPR.

ABSTRACT

The oxidation of glycerol has been the subject of several studies worldwide; in general, these studies main goal is to find an appropriate catalyst to selectively convert this building-block molecule into value-added products. Laccases immobilized on solid supports are environment-friendly heterogeneous catalysts, which can be applied for the oxidation of glycerol in a laccase-mediated system. These enzymes contain copper atoms in their structure and catalyze the oxidation of many phenolic compounds with the concomitant reduction of water to molecular oxygen. Despite their specificity, when properly combined with mediators, laccases can also act on the oxidation of non-phenolic compounds. This study addressed the synthesis and characterization of nanoscale zeolites – FAU, BEA, LTA and MFI morphologies –, the application of these materials as support for the immobilization of different commercial laccases – from *A. bisporus*, *Aspergillus sp.* and *P. ostreatus* –, and the use of the complexes obtained for 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) mediated glycerol oxidation. All zeolites were synthesized according to the literature, and the sodium form of the FAU zeolite modified by ion exchange with Cu^{2+} to generate an extra support. The synthesized materials were amino-functionalized to allow the laccases to be immobilized covalently. The supports were characterized by XRD, SEM-EDX, HRTEM, FTIR, and the free enzymes or complexes spectroscopically evaluated through the oxidation of the compound 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Based on the ABTS oxidation activities, the complexes FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB, FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp, and BEAc/APTMS/GA/LAsp were selected to be applied in the glycerol oxidation reactions. For comparison, the enzymes LPO, LAB and LAsp in free form and the supports FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA and BEAc/APTMS/GA were applied under similar reaction conditions. All reactions using the laccases/nanozeolites complexes showed, after 48 h of reaction, low glycerol conversion – less than 5%. However, a high selectivity was observed for glyceraldehyde, above 88% in all cases. There was no conversion of glycerol using only supports without enzyme. On the other hand, when the enzymes LPO and LAsp were applied in their free forms, the glycerol conversions obtained were significantly superior in comparison to the complexes – ~29% for LAsp and more than 80% for LPO, after 48 h of reaction. Selectivities of 57.10% to glyceraldehyde and 25.75% to glyceric acid, were quantified from the reactions with the free LPO enzymes, while from the reaction with free LAsp, the selectivity to glyceraldehyde was 78%, and the second most yielded product was glyoxylic acid, 11.47%. The LAB laccase in the free form showed a much lower conversion when compared to the others

– ~3.2% after 48 h. In order to understand what reasons led to the reduction of enzyme activity after immobilization on nanozeolitic materials, a systematic study using cyclic voltammetry was employed for LAsp. This study pointed out that the redox potential of this enzyme is a limiting factor in its application, and that in an acid environment, the oxidation rate of the TEMPO mediator is quite low. With the use of electronic paramagnetic resonance (EPR), it was possible to infer that the enzymatic immobilization caused structural distortions in the LAsp, in particular, in the copper centers of its catalytic site, since significant variations in the spin Hamiltonians (tensors \mathbf{g} , and hyperfine coupling constants \mathbf{A}) were observed when enzymes in solution or immobilized were compared. The spectra also revealed a high pH dependence on the interaction of the copper sites with the coordination ligands. In addition, the parallel spin Hamiltonians of copper T2 of the enzyme immobilized in zeolite BEAc/APTMS/GA ($g_{\parallel} = 2.275$, $A_{\parallel} = 173.4 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) are closer to the free enzyme at pH 7 ($g_{\parallel} = 2.275$, $A_{\parallel} = 170.1 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$) than at pH 4 ($g_{\parallel} = 2.275$, $A_{\parallel} = 220.2 \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$). This indicates that the pH of the enzymatic microenvironments after immobilization is neutral, and this is likely to be the reason for the reduction in enzymatic activity after immobilization on the zeolitic supports.

Keywords: Glycerol. Lacase. Nanozeolite. Immobilization. Oxidation. Cyclic Voltammetry. EPR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processos de conversão catalítica do glicerol.	31
Figura 2. Possíveis caminhos de reação e produtos formados na reação de oxidação do glicerol.	33
Figura 3. Típicos espectros de absorção (A) e EPR (B) de lacases.	38
Figura 4. Representação do sítio catalítico e esquema reacional da lacase de <i>Trametes hirsuta</i>	39
Figura 5. Estruturas moleculares de alguns mediadores empregados em sistemas lacase-mediador.	40
Figura 6. Voltamogramas cíclicos em eletrodo disco de carbono vítreo para soluções 10 mM de TEMPO em 50% <i>t</i> -butanol/50% água contendo carbonato de sódio/bicarbonato, pH 9,3. Velocidade de varredura 50 mV/s. Temperatura 293 K.	42
Figura 7. Voltamograma cíclico de solução 10 mM ABTS. Velocidade de varredura 200 mV/s. Insert apresenta voltamogramas para diferentes velocidades de varredura.	43
Figura 8. Métodos de imobilização enzimática.	44
Figura 9. Estrutura de quatro tipos de zeólitas (faujasitas X e Y; ZSM-12; ZSM-5 ou silicalita-1; Theta-1 ou ZSM-22) e seus respectivos sistemas microporosos e dimensões.	48
Figura 10. Funcionalização química de superfície de silicatos por silanização com amino silanos e ativação com agente espaçador glutaraldeído, para posterior imobilização enzimática via ligação covalente.	58
Figura 11. Regressão linear da curva "Área abaixo da curva" vs. "Concentração" para o composto ácido tartrônico, com tempo de retenção $10,07 \pm 0,08$ minutos.	66
Figura 12. Difrátogramas de raios X das nanozeólitas como sintetizada (FAU/Na ⁺) e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc).	76
Figura 13. Difrátogramas de raios X das nanozeólitas TS-1, ZSM-5, LTA e BEA como	

sintetizadas e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc).	76
Figura 14. FTIR das nanozeólitas como sintetizadas (TS-1, ZSM-5, LTA e BEA) e após calcinação (TS-1c, ZSM-5c, LTAc e BEAc). Setas numeradas indicam as seguintes bandas: 1 – 2990 cm^{-1} , 2 – 2890 cm^{-1} , 3 – 3450 cm^{-1} , 4 – 3650 cm^{-1} , 5 – 1490 cm^{-1} , 6 – 1390 cm^{-1} , 7 – 1170 cm^{-1} e 8 – 960 cm^{-1}	77
Figura 15. Difratomogramas de raios X das amostras FAU/Na e LTAc.	78
Figura 16. Espectros de FTIR da região entre 2100 e 400 cm^{-1} das nanozeólitas FAU/Na ⁺ e LTAc.	79
Figura 17. Difratomogramas de raios X das nanozeólitas TS-1c e ZSM-5c.	80
Figura 18. Espectros de FTIR da região entre 1300 a 400 cm^{-1} das nanozeólitas TS-1c e ZSM-5c.	81
Figura 19. Difratomogramas de raios X da nanozeólita faujasita como sintetizada (FAU/Na ⁺) e após troca iônica com cobre 0,5 M (FAU/Cu ²⁺).	82
Figura 20. FTIR da nanozeólita faujasita antes (FAU/Na ⁺) e após troca iônica com cobre 0,5M (FAU/Cu ²⁺).	83
Figura 21. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos materiais nanozeolíticos.	85
Figura 22. MEV da amostra FAU/Cu ²⁺ com aumento de 2000x.	87
Figura 23. Captura de tela da janela de exibição do programa Match!* expondo o padrão de difração da amostra FAU/Cu ²⁺ (linha azul contínua) comparada com um padrão de difração do mineral “antlerite” (linhas verticais pretas e tracejadas).	88
Figura 24. Imagens por MET de campo claro (esquerda) e campo escuro (direita) da amostra FAU/Cu ²⁺	90
Figura 25. Mapeamento por EDXS de duas partículas com morfologias diferentes (1) dos componentes Oxigênio (2), Silício (3), Alumínio (4), Cobre (5) e Enxofre (6) do material FAU/Cu ²⁺	91
Figura 26. Análise de EDXS de regiões das morfologias tipo globular (1- Área 1) e placa (2-	

Área 2).....	92
Figura 27. Imagens de campo claro (1), campo escuro (2), e mapeamento por EDXS dos componentes Oxigênio (3), Silício (4), Alumínio (5), Cobre (6) e Enxofre (7) de aglomerados de partículas com morfologias diferentes do material FAU/Cu ²⁺	93
Figura 28. FTIR da nanozeólita TS-1c antes, e após silanização (TS-1c/APTMS) e funcionalização (TS-1c/APTMS/GA).	94
Figura 29. FTIR da nanozeólita ZSM-5c antes, e após silanização (ZSM-5c/APTMS) e funcionalização (ZSM-5c/APTMS/GA).....	95
Figura 30. FTIR da nanozeólita FAU/Na ⁺ antes, e após silanização (FAU/Na ⁺ /APTMS) e funcionalização (FAU/Na ⁺ /APTMS/GA).	96
Figura 31. FTIR da nanozeólita FAU/Cu ²⁺ antes, e após silanização (FAU/Cu ²⁺ /APTMS) e funcionalização (FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA).....	96
Figura 32. FTIR da nanozeólita LTAc antes, e após silanização (LTAc/APTMS) e funcionalização (LTAc/APTMS/GA).	97
Figura 33. FTIR da nanozeólita TS-1c antes, e após silanização (TS-1c/APTMS) e funcionalização (TS-1c/APTMS/GA).	97
Figura 34. Temperatura ótimas das lacases LPO, LAB e LAsp em solução. <i>A atividade da LPO em 60 °C foi adotada como 100%.</i>	99
Figura 35. Termoestabilidade da lacase de <i>P. ostreatus</i> . A atividade da LPO em 60 °C após 0 minutos foi adotada como 100%.	100
Figura 36. Termoestabilidade da lacase de <i>A. bisporus</i> . A atividade da LAB em 60 °C após 60 minutos foi adotada como 100%.	101
Figura 37. Termoestabilidade da lacase de <i>Aspergillus</i> sp.. A atividade da LAsp em 60 °C após 0 minuto foi adotada como 100%.....	102
Figura 38. pH ótimo para as lacases LPO, LAB e LAsp a 45 °C. <i>A atividade de cada lacase em pH 3 foi adotada como 100%.</i>	103

Figura 39. Estabilidade da lacase LPO para diferentes pHs.....	104
Figura 40. Estabilidade da lacase LAB para diferentes pHs.	105
Figura 41. Estabilidade da lacase LAsp para diferentes pHs.	105
Figura 42. Influência de metais de transição na atividade da lacase LPO a 45 °C. <i>A atividade da LPO na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.</i>	107
Figura 43. Influência de metais de transição na atividade da lacase LAB a 45 °C. <i>A atividade da LAB na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.</i>	107
Figura 44. Influência de metais de transição na atividade da lacase LAsp a 45 °C. <i>A atividade da LAsp na ausência de metais de transição foi adotada como 100%.</i>	108
Figura 45. Testes de atividade das amostras A, B e C diluídas 400 vezes em tampão fosfato, 100 mM, pH 7. Comprimento de onda = 436 nm. ABTS usado como substrato.....	110
Figura 46. Atividade enzimática da LAsp purificada após incubação em diferentes tampões a 8 °C acompanhada no tempo. Os tampões utilizados foram: a – 100 mM tampão acetato pH 4,5; b – 50 mM tampão acetato pH 4,5; c – 100 mM tampão fosfato pH 7,0; d – 100 mM tampão citrato pH 4,5; e – 100 mM tampão succinato pH 4,5; f – 50 mM tampão succinato pH 4,5. Parte (A) apresenta integralmente as curvas obtidas no experimento, (B) evidencia as primeiras 24 horas e (C) compara as primeiras 24 horas para os tampões com pH 4,5.....	112
Figura 47. ATR-FTIR das lacases LAB (sólido) e LAsp (solução). Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm ⁻¹ (1), 2885 cm ⁻¹ (2), 1548 cm ⁻¹ (3), 1470 cm ⁻¹ (4), 1255 cm ⁻¹ (5), 1142 cm ⁻¹ (6) e 960 cm ⁻¹ (7).....	117
Figura 48. ATR-FTIR do material FAU/Na ⁺ /APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm ⁻¹ (1), 2982 cm ⁻¹ (2), 2885 cm ⁻¹ (3), 1640 cm ⁻¹ (4), 1311 cm ⁻¹ (5) e 1215 cm ⁻¹ (6).....	117
Figura 49. ATR-FTIR do material TS-1c/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm ⁻¹ (1), 2982 cm ⁻¹ (2), 2885 cm ⁻¹ (3) e 1730 cm ⁻¹ (4).	118
Figura 50. ATR-FTIR do material ZSM-5c/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases	

LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm^{-1} (1), 2982 cm^{-1} (2), 2885 cm^{-1} (3), 1730 cm^{-1} (4) e 1380 cm^{-1} (5)..... 118

Figura 51. ATR-FTIR do material FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 3400 cm^{-1} (1), 2982 cm^{-1} (2), 1640 cm^{-1} (3) e 1380 cm^{-1} (4). 119

Figura 52. ATR-FTIR do material LTAc/APTMS/GA antes e após a imobilização da lacase LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm^{-1} (1), 2885 cm^{-1} (2), 1380 cm^{-1} (3), 1255 cm^{-1} (4) e 1147 cm^{-1} (5). 119

Figura 53. ATR-FTIR do material BEAc/APTMS/GA antes e após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp. Bandas assinaladas correspondentes aos números de onda 2982 cm^{-1} (1), 2885 cm^{-1} (2), região entre 1580 e 1150 cm^{-1} (3) e 960 cm^{-1} (4). 120

Figura 54. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO. *A atividade do complexo em 30 °C e pH 3 foi adotada como 100%.* 121

Figura 55. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB. *A atividade do complexo em 30° e pH 3 foi adotada como 100%.* 122

Figura 56. Efeito da temperatura e do pH na atividade catalítica do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp. *A atividade do complexo em 30° e pH 3 foi adotada como 100%.* 123

Figura 57. Estabilidade do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LPO, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C..... 124

Figura 58. Estabilidade do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAB, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C..... 124

Figura 59. Estabilidade do complexo FAU/ Cu^{2+} /APTMS/GA/LAsp, pH 3, temperaturas 30 e 45 °C..... 125

Figura 60. Acompanhamento temporal da concentração dos produtos ácido glioxílico, ácido glicérico e gliceraldeído das reações de oxidação do glicerol catalisadas pelas enzimas LAsp e

LPO na forma livre mediadas por TEMPO. 130

Figura 61. CV de soluções 0,1 mM TEMPO (esquerda) e ABTS (direita) utilizando eletrodo GCE. Eletrólito suporte: tampão acetato, 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 10 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9. 135

Figura 62. CV de 0,5 mM ABTS em eletrodo GCE original e após modificação com lacase (GCE/LAsp). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 5 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 10. 136

Figura 63: CV de 0,5 mM TEMPO em eletrodo GCE original e após modificação com lacase (GCE/LAsp). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM, pH 5. Velocidade de varredura: 5 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 10. 137

Figura 64. Voltamogramas cíclicos de 10 mM TEMPO no eletrodo GCE. Eletrólitos suporte: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; tampão carbonato de sódio/bicarbonato 100 mM, pH 9;7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 11. 138

Figura 65. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M glicerol (b), após 15 minutos (c) e por fim, após 30 minutos (d). Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosferas ambiente ou nitrogênio. Protocolo 11. 139

Figura 66. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL (b), e após 15 minutos (c). Logo após a varredura anterior, 100 μ L de solução 1 M de glicerol foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (d), após 15 minutos (e) and finalmente, após 30 minutos (f). Os passos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** (esquerda) foram repetidos na ausência de TEMPO como controle, curvas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (direita), respectivamente. Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 11. 141

Figura 67. CV de soluções 10 mM de TEMPO no eletrodo GCE original no eletrólito suporte apenas (a), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL (b), e após 15

minutos (c). Logo após a varredura anterior, 100 μ L de solução 1 M de glicerol foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (d), após 15 minutos (e) and finalmente, após 30 minutos (f). Os passos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** (esquerda) foram repetidos na ausência de TEMPO como controle, curvas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (direita), respectivamente. Eletrólitos suportes: tampão acetato 100 mM, pH 4,5; tampão fosfato 100 mM, pH 7; e tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,7. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11. 142

Figura 68. CV no eletrodo GCE das soluções: A) eletrólito suporte apenas (1), logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (2), após 15 minutos (3) e finalmente, após 30 minutos (4) // B) 0,1 mM TEMPO no tempo zero (5), e após 15 minutos (6). Logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (7), após 15 minutos (8) e finalmente, após 30 minutos (9) // C) eletrólito suporte apenas (10), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (11), e após 15 minutos (12). Por fim, 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (13), após 15 minutos (14) and finalmente, após 30 minutos (15) // D) 0,1 mM TEMPO (16), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (17), e após 15 minutos (18). Em sequência, 100 μ L 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (19), repetida após 15 minutos (20) and finalmente, após 30 minutos (21). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM pH 4,5. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11. 144

Figura 69. CV no eletrodo GCE das soluções: A) eletrólito suporte apenas (1), logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (2), após 15 minutos (3) e finalmente, após 30 minutos (4) // B) 0,1 mM TEMPO no tempo zero (5), e após 15 minutos (6). Logo após a adição de 100 μ L de solução de glicerol 1 M na célula (7), após 15 minutos (8) e finalmente, após 30 minutos (9) // C) eletrólito suporte apenas (10), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (11), e após 15 minutos (12). Por fim, 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (13), após 15 minutos (14) and finalmente, após 30 minutos (15) // D) 0,1 mM TEMPO (16), logo após a adição de 20 μ L de solução enzimática (LAsp) 60 mg/mL no tempo zero (17), e após 15 minutos (18). Em sequência, 100 μ L 100 μ L de solução de glicerol 1 M foram adicionados à célula e varredura realizada imediatamente (19), repetida após 15 minutos (20) and finalmente, após 30 minutos (21). Eletrólito suporte: tampão acetato 100 mM pH 4,5. Velocidade de varredura: 50 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 11. 145

Figura 70. CV de 50 μ M catecol em tampão fosfato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE antes ou após modificação: A) não modificado GCE background (a1) e analito (a2); GCE/LAsp background (a3) e analito (a4). B) GCE/NF background (b1) e analito (b2); GCE/LAsp/NF background (b3) e analito (b4). C) GCE/BEAc/APTMS/GA/NF background (c1) e analito (c2); GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/NF background (c3) e analito (c4). D) GCE/GO/NF background (d1) e analito (d2); GCE/GO/LAsp/NF background (d3) e analito (d4). E) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/NF background (e1) e analito (e2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/LAsp/NF background (e3) e analito (e4). F) GCE/GNP/NF background (f1) e analito (f2); GCE/GNP/LAsp/NF background (f3) e analito (f4). G) GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF background (g1) e analito (g2); GCE/BEAc/APTMS/GA/LAsp/GO/NF background (g3) e analito (g4). H) GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/NF background (h1) e analito (h2); GCE/BEAc/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF background (h3) e analito (h4). I) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GO/NF background (i1) e analito (i2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GO/LAsp/NF background (i3) e analito (i4). J) GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GNP/NF background (j1) e analito (j2); GCE/FAU/Cu²⁺/APTMS/GA/GNP/LAsp/NF background (j3) e analito (j4). Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Background trata da varredura na ausência de analito, eletrólito suporte apenas. Protocolo 12. 147

Figura 71. CV de 50 μ M catecol em tampão fosfato, 100 mM, pH 5, no eletrodo CGE antes e após modificação com BEA/APTMS/GA, GO e LAsp. Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera de nitrogênio. Protocolo 12. 149

Figura 72. CV de tampão fosfato, 100 mM, pH 5, utilizando os eletrodos GCE/BEAc/APTMS/GA/GO/NF (A e C) 1^a varredura (a), 7^a varredura (b) e 2^a a 6^a varreduras (e); GCE/BEA/APTMS/GA/GO/LAsp/NF electrode (B e D) 1^a varredura (c), 7^a varredura (d) e 2^a a 6^a varreduras (f). (E) compara as curvas b e d. (F) mostra a subtração de da curva b da curva d. O insert em (F) evidencia os picos de corrente (p1 e p2), cuja forma é similar à de um “pato”, comum em voltametria cíclica. Velocidade de varredura: 100 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 12. 152

Figura 73. CV (esquerda) de solução 0,1 mM ABTS em tampão acetato 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE para diferentes velocidades de varredura: a – 10 mV/s, b – 20 mV/s, c – 40 mV/s, d – 80 mV/s, e – 120 mV/s, f – 160 mV/s e g – 200 mV/s. No lado direito são mostrados as

intensidades de corrente dos picos I, II, III e IV versus a raiz quadrada da velocidade de varredura v. Fit linear em cinza. Protocolo 9.....	153
Figura 74. CV de soluções 0,1 mM TEMPO e derivados TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE. Velocidade de varredura: 10 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9.	155
Figura 75. CV de soluções 0,1 mM TEMPO (A), 4-oxo-TEMPO (B), 4-hidroxi-TEMPO (C) e 4-amino-TEMPO em tampão acetato, 100 mM, pH 5, no eletrodo GCE electrode. Velocidades de varredura: a – 10 mV/s, b – 20 mV/s, c – 40 mV/s, d – 80 mV/s, e – 120 mV/s, f – 160 mV/s e g – 200 mV/s. Atmosfera ambiente. Protocolo 9.....	155
Figura 76. Espectros de EPR na banda X das nanozeólitas (linhas pontilhadas) e complexos nanozeólitas/LAsp (linhas contínuas). Aproximadamente 100 mg de material sólido foram transferidas para os tubos de EPR, e conteúdo congelado em nitrogênio líquido antes de ser transferido para a cavidade de amostra do espectrômetro.....	157
Figura 77. Espectros de EPR na banda X das nanozeólitas LTAc/APTMS/GA e BEAc/APTMS/GA para intervalo largo de 100 a 400 mT.	158
Figura 78. Espectros de EPR na banda X de lacase purificada – pH7 e 4,5 – e não purificada – pH 7 – (parte superior). 100 µL de solução 200 µM lacase em tampão citrato, 50 mM, pH 4,5, ou fosfato, 50 mM, pH 7, foram transferidos para os tubos de EPR, e os conteúdos congelados em nitrogênio líquido antes de serem transferidos para a cavidade de amostras do espectrômetro. Na parte inferior estão comparados os espectros da lacase purificada pH 7 com os diferentes complexos lacase/nanozeólitas na região espectral dos cobres T1 e T2: FAU/Na ⁺ /APTMS/GA/LAsp, TS1c/APTMS/GA/LAsp, ZSM-5c/APTMS/GA/LAsp, LTAc/APTMS/GA/LAsp e BEAc/APTMS/GA/LAsp. Espectros completos foram apresentados na Figura 76	159
Figura 79. Espectros de EPR na banda X experimentais (linhas pretas) da LAsp purificada pH 7 (A) e pH 4,5 (B), não purificada (C), e dos complexos BEAc/APTMS/GA/LAsp (D) e FAU/Na ⁺ /APTMS/GA/LAsp (E), comparados com os espectros teóricos obtidos das simulações no software Easyspin (linhas azuis).....	161
Figura 80. Contribuições isoladas da simulações dos sítios T1 e T2/ ¹⁴ N para geração do espectro combinado T1+T2/ ¹⁴ N para a LAsp purificada em pH7 e 4,5.....	163

Figura 81. Sequência de resíduos de aminoácidos da lacase de <i>M. thermophila</i> extraída da patente WO2016007309A1.	164
Figura 82. Centro ativo da lacase de <i>M. thermophila</i> apresentando os sítios mononuclear de cobre T1 e trinuclear de cobres T2/T3 com os respectivos resíduos de coordenação equatorial. Figura gerada no software Pymol utilizando a sequência disponibilizada no PDB: 6F5K. ¹⁷⁶	165
Figura 83. Diagrama de Peisach-Blumberg, ¹⁷⁷ para um complexo quadrado-planar de Cu (II). Os domínios ($g//$, $A//$) estão definidos para diferentes coordenações equatoriais e diversas cargas do complexo. As linhas rosas são e os pontos A e B são aproximações dos cruzamentos dos valores determinados neste estudo para a LAsp/MtL.....	166
Esquema 1. Mecanismo proposto para oxidação de um substrato por TEMPO num sistema lacase-mediado.	41
Esquema 2. As formas oxidadas do ABTS.....	42
Quadro 1. Três passos de modificação do eletrodo GCE.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração das soluções estoque das lacases LPO e LAB, e da solução comercial da LAsp e respectivas atividades específicas.	61
Tabela 2. Análises de EDS das nanozeólitas sintetizadas.....	86
Tabela 3. Concentração estimada de amostras enzimáticas.....	109
Tabela 4. Percentual de imobilização, atividade remanescente e atividade catalítica dos complexos nanozeólitas/lacases formados após a imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp nos diferentes suportes sintetizados.....	115
Tabela 5. Tempos de retenção e parâmetros de regressão linear das curvas padrão de diferentes possíveis produtos da reação de oxidação do glicerol por análises de HPLC.....	127
Tabela 6. Catalisadores e temperaturas das reações de oxidação do glicerol.....	128
Tabela 7. Conversão (%) e seletividade (%) da reação de oxidação do glicerol laccase/TEMPO-mediada por laccases livres ou imobilizadas.....	129
Tabela 8. Comparação das condições experimentais e produção das reações de oxidação do glicerol laccase/TEMPO mediada relatadas na literatura com o presente trabalho.	133
Tabela 9. Comparação numérica entre GCE modificado e não modificado.....	150
Tabela 10. Valores de g e da constante de acoplamento hiperfino A para os centros de cobre T1 e T2 dos espectros simulados.	162
Tabela 11. Potencial redox (E^0_{T1}), resíduo da posição axial do cobre T1, e parâmetros paramagnéticos dos cobres T1 e T2 de diversas lacases descritas na literatura.	168

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Concentração de proteína imobilizada.....	61
Equação 2. Atividade enzimática de lacases em solução ou imobilizadas.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
APTMS	(3-aminopropil)trimetoxisilano
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada
BEA	Zeólita beta.
CLEAs	Agregados de enzima por ligação cruzada do Inglês “ <i>Cross-linked enzyme aggregates</i> ”
CV	Voltamograma Cíclico e Voltametria Cíclica do Inglês “ <i>Cyclic Voltammogram</i> ”
DCM	Diclorometano
DRX	Difração de Raios-X
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FAU	zeólita Faujasita tipo X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
GNP	Nanoplatelets de grafeno
GO	Óxido de grafeno
LAB	Lacase de <i>Agaricus bisporus</i>
LA_{sp}	Lacase de <i>Aspergillus</i> sp.
LPO	Lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i>
LTA	Zeólita denominada “linde type A”
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MFI	Morfologia das zeólitas TS-1 e ZSM-5
NF	Polímero Nafion
PDB	Protein Data Bank
TEMPO	<i>N</i> -oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
TS-1	Zeólita Titânio Silicato-1
U	Unidade de atividade enzimática
ZSM-5	Zeólita denominada “Zeolite Socony Mobil-5”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
2.1	Biodiesel e a geração de glicerol	30
2.2	Química do glicerol	30
2.3	Oxidação do Glicerol	32
2.3.1	Oxidação do glicerol via catálise heterogênea	33
2.3.2	Oxidação do glicerol via catálise homogênea	34
2.3.3	Oxidação do glicerol via biocatálise	35
2.4	Lacases	36
2.4.1	UV-Vis e EPR dos cobres T1, T2 e T3 de lacases	37
2.4.2	Mecanismo geral de reação de lacases	38
2.4.3	Sistemas lacase-mediador	39
2.4.4	Eletroquímica dos mediadores TEMPO e ABTS	41
2.5	Imobilização de enzimas	43
2.5.1	Imobilização de enzimas lacases	45
2.6	Zeólitas, nanozeólitas e sínteses de materiais zeolíticos	47
2.6.1	Imobilização de enzimas em materiais zeolíticos	49
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivos gerais	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1	Sínteses das nanozeólitas	54
4.1.1	Síntese da Nanozeólita Faujasita tipo X	54
4.1.2	Síntese da Nanozeólita Titanosilicalita 1	55
4.1.3	Síntese da Nanozeólita ZSM-5	55
4.1.4	Síntese da Nanozeólita LTA	56
4.1.5	Síntese da Nanozeólita Beta	56
4.1.6	Troca Iônica da Nanozeólita FAU/Na ⁺ com Cu ²⁺	57
4.2	Funcionalização química da superfície das nanozeólitas sintetizadas	57
4.2.1	Primeira etapa: Silanização das nanozeólitas sintetizadas	58
4.2.2	Segunda etapa: Funcionalização com glutaraldeído dos materiais silanizados	58

4.3	Caracterização dos materiais zeolíticos sintetizados	59
4.4	Imobilização de enzimas sobre as nanozeólitas	60
4.5	Medida da Atividade Enzimática por espectroscopia	61
4.5.1	Protocolo 1 – verificação da atividade enzimática das soluções estoque e das soluções antes ou após imobilização	62
4.5.2	Protocolo 2 – verificação da atividade enzimática variando-se a temperatura	63
4.5.3	Protocolo 3 – verificação da atividade enzimática variando-se o tempo de incubação	63
4.5.4	Protocolo 4 – verificação da atividade enzimática variando-se o pH	63
4.5.5	Protocolo 5 – verificação da atividade enzimática na presença de metais de transição	63
4.5.6	Protocolo 6 – verificação da atividade enzimática dos complexos enzima/nanozeólita	64
4.5.7	Protocolo 7 – verificação da estabilidade enzimática variando-se o pH	64
4.5.8	Protocolo 8 – verificação da estabilidade dos complexos enzima/nanozeólita nas condições ótimas determinadas	64
4.6	Oxidação do glicerol	65
4.7	Análise dos produtos das reações de oxidação do glicerol por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	65
4.8	Concentração, troca de tampão e estudos da estabilidade da lacase comercial de <i>Aspergillus sp.</i> (LAsp)	67
4.8.1	Protocolo de filtragem e medida de atividade dos filtrados	67
4.8.2	Verificação da estabilidade da enzima LAsp em diferentes tampões acompanhada no tempo	68
4.9	Avaliação da lacase LAsp por técnicas eletroquímicas	69
4.9.1	Protocolo 9 – voltametria cíclica de TEMPO e ABTS	69
4.9.2	Protocolo 10 – deposição de lacase (LAsp) na superfície do eletrodo GCE	70
4.9.3	Protocolo 11 – acompanhamento eletroquímico da oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada	70
4.9.4	Protocolo 12 – modificação do eletrodo de carbono vítreo utilizando nano compostos de zeólitas e grafeno	71
4.10	Avaliação da lacase LAsp e complexos nanozeólita por Ressonância Paramagnética Eletrônica – EPR	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	75
5.1	Síntese e Caracterização dos Materiais Zeolíticos	75
5.1.1	Análises por DRX e FTIR das nanozeólitas sintetizadas	75
5.1.2	MEV e EDS das Nanozeólitas sintetizadas	83

5.1.3	MET e EDS do material FAU/Cu ²⁺	87
5.2	Silanização e funcionalização química dos materiais zeolíticos sintetizados	93
5.3	Estudo do comportamento das lacases LPO, LAB e LAsp na forma livre quando variadas as condições reacionais	98
5.3.1	Temperatura ótima das lacases LPO, LAB e LAsp	98
5.3.2	Termoestabilidade das lacases LPO, LAB e LAsp	99
5.3.3	pH ótimo das lacases LPO, LAB e LAsp	102
5.3.4	Estabilidade das lacases LPO, LAB e LAsp sob diferentes pHs	104
5.3.5	Efeito de metais de transição em solução na atividade catalítica das lacases estudadas	106
5.3.6	Concentração, troca de tampão e estudos da estabilidade da lacase comercial de <i>Aspergillus</i> sp. (LAsp)	109
5.4	Imobilização enzimática nos suportes nanozeolíticos e estudos dos complexos formados	113
5.4.1	Imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp nos diferentes suportes nanozeolíticos sintetizados	113
5.4.2	Caracterização por ATR-FTIR dos complexos nanozeólitas/lacases	116
5.4.3	Estudo das condições ótimas de ação dos complexos formados pela imobilização das lacases LPO, LAB e LAsp no suporte FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	120
5.5	Reações de oxidação do glicerol	125
5.5.1	Curvas padrão para quantificação dos produtos de oxidação do glicerol por HPLC	125
5.5.2	Reações de Oxidação do Glicerol utilizando os catalisadores selecionados	127
5.6	Estudos eletroquímicos	134
5.6.1	Investigação eletroquímica utilizando o eletrodo GCE original aplicado a TEMPO, ABTS, lacase e glicerol	134
5.6.2	Modificação da superfície de trabalho do eletrodo GCE utilizando nano compostos de zeólitas e grafeno	145
5.6.3	Estudos eletroquímicos de ABTS, TEMPO, e derivados de TEMPO	153
5.7	Análises de EPR na banda X da lacase LAsp livre em solução ou imobilizada em nanozeólitas	156
6	CONCLUSÕES	170
7	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	172
	REFERÊNCIAS	173

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, foi crescente a produção de biodiesel, uma fonte alternativa e renovável de combustível. A busca por combustíveis renováveis foi e ainda é motivada pela preocupação mundial com o meio ambiente. No entanto, o aumento na produção de biodiesel levou ao aumento na produção de glicerol – coproduto principal da produção de biodiesel – e concomitante ao excesso deste produto no mercado, o que, por consequência, leva a sua desvalorização. O glicerol, é conhecidamente utilizado como solvente renovável em muitos processos químicos. No entanto, o glicerol bruto obtido das reações de transesterificação demanda altos custos com purificação para que possa ser utilizado no meio industrial, o que reduz sua apreciação e ao mesmo tempo, desvaloriza a produção do biodiesel, importante para a sustentabilidade no nosso planeta.

Alternativamente, o glicerol tem sido utilizado como um bloco de construção versátil. A síntese de produtos com valor agregado a partir do glicerol é bastante atrativa, pois valoriza a produção de biodiesel e torna a purificação do coproduto um processo economicamente viável e, além disso, sustentável.² Por outro lado, a transformação de glicerol em novos produtos é altamente dependente das rotas catalíticas e dos catalisadores utilizados. Dentre estas rotas, a oxidação é uma rota que permite a conversão do glicerol em diversos produtos de valor agregado.³ Entretanto, a oxidação seletiva do glicerol é desafiadora, pois demanda o uso de catalisadores apropriados e a determinação de condições de catálise específicas (pH, temperatura, pressão, etc.).⁴ Entre os produtos de oxidação do glicerol, destacam-se o ácido mesoxálico, o ácido tartrônico, a 1,3-dihidroxiacetona e o ácido glicérico. Esses produtos são classicamente aplicados nas indústrias químicas, farmacêuticas e de cosméticos,^{5; 6; 7; 8; 9; 10; 11;}¹² sendo geralmente obtidos utilizando catalisadores caros e em quantidades estequiométricas, com resíduos tóxicos de impacto ambiental negativo, reduzindo, portanto, o interesse industrial.^{8; 13}

Diversos trabalhos foram descritos na literatura sobre o uso de metais nobres suportados – platina, paládio, partículas de ouro, entre outros – aplicados na oxidação seletiva do glicerol.¹⁴ Apesar do caráter heterogêneo destes catalisadores, os custos deste catalisadores são elevados, e em alguns casos as condições de catálise exigem altas pressões e temperaturas, o que contribui para a desativação dos catalisadores. Isso reduz a vida útil dos catalisadores, limita suas reutilizações, e conseqüentemente torna o processo menos atrativo economicamente.^{3; 15}

Em 2009, um estudo descrevendo o uso de um novo tipo de catalisador para a oxidação do glicerol foi descrito por Liebminger *et al.* (2009).¹⁶ Trata-se do uso de enzimas oxidases contendo cobre – metaloproteínas – que num sistema mediado por *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) podem auxiliar na transformação do glicerol. Eles utilizaram a lacase de *T. hirsuta* livre em solução ou imobilizada em pellets de sílica para esta finalidade, e observaram a oxidação sequencial do glicerol a gliceraldeído, ácido glicérico, ácido tartrônico e, por fim, ácido mesoxálico. Além disso, verificaram uma dependência da produção com a concentração do mediador – quanto maior a concentração de TEMPO, maior a conversão de glicerol no período investigado. Ademais, um comportamento enzimático divergente – da enzima na forma livre comparada com a mesma imobilizada – foi destacado. Embora a enzima livre tenha sido mais efetiva cataliticamente, a mesma, careceu de estabilidade. A forma imobilizada, pelo contrário, apresentou maior estabilidade no tempo.

Ainda é pequeno o número de trabalhos que abordaram a oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada, que além do trabalho pioneiro de Liebminger *et al.* (2009)¹⁶ foi estudado apenas – no melhor do nosso conhecimento – por Hong *et al.* (2015),¹⁵ (2018),¹⁷ e (2019).¹⁸ Muita informação e investimento são necessários para o aprimoramento desta tecnologia. Apesar disso, a ideia geral é bastante atrativa e têm vários pontos a seu favor. Por exemplo, faria o uso de um catalisador não tóxico e ambientalmente favorável para a oxidação do glicerol. Isso valorizaria economicamente o glicerol e, concomitantemente, valorizaria a produção de biodiesel, pois o glicerol produzido, que no momento tem pouca utilidade e é bastante barato, passaria a ser de maior interesse e competiria com o glicerol obtido por outras rotas. No entanto, o uso de enzimas em catálise é limitado devido, majoritariamente, aos seus altos custos de produção. Para contornar este empecilho, a estratégia de imobilização enzimática ganhou espaço, pois permite o uso múltiplo do catalisador (catálise heterogênea). A busca por suportes que mantenham – ou até mesmo aumentem – o potencial catalítico de enzimas é a base das pesquisas que envolvem imobilização.

Uma classe de materiais que se destaca como suporte para imobilização enzimática são as zeólitas. Estes materiais, tanto em escala micrométrica como nanométrica, foram descritos como suportes efetivos para imobilização e manutenção da atividade catalítica de várias enzimas. As aplicações destes complexos são diversas, abrangendo, por exemplo, sistemas catalíticos ou de sensoriamento.^{19; 20; 21; 22; 23; 24; 25} Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foram descritos o uso de nanozeólitas como suportes para a imobilização de lipases e

respectivas aplicações para a produção de biodiesel.^{26; 27} A modulação destes materiais inorgânicos permitiu uma larga busca por suportes que não apenas mantiveram, como também aumentaram, a atividade das enzimas testadas. Além disso, os complexos apresentaram boa estabilidade e múltiplas reutilizações.

A redução dos tamanhos de zeólitas para a escala nanométrica pode levar a variações significativas em suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, aumentar suas áreas externas, permitir melhor acesso e exposição de seus sítios ativos, e aumentar a dispersibilidade tanto em meio aquoso quanto orgânico. Ademais, as superfícies destas nanopartículas podem ser facilmente moduladas, especialmente no que diz respeito a carga superficial e hidrofobicidade/hidrofilicidade.²⁸ Com base nisso e, levando em consideração experiências anteriores,^{26; 27} esta classe de materiais foi escolhida para aplicação como suporte de imobilização de enzimas lacase neste trabalho visando a aplicação dos complexos formados na oxidação do glicerol num sistema TEMPO-mediado. Até o momento, no melhor do nosso conhecimento, não há relatos sobre o uso de nanozeólitas para imobilização de lacases e aplicação dos complexos na oxidação do glicerol.

Este trabalho teve como foco a síntese e caracterização de materiais nanozeolíticos, e o uso destes suportes para imobilização de lacases comerciais de diferentes organismos – lacases estas nunca antes utilizadas neste sistema. Os catalisadores obtidos foram aplicados na reação de oxidação do glicerol TEMPO-mediada. Além disso, estudos sistemáticos, das enzimas em solução e/ou imobilizadas, foram realizados com uso de diversas técnicas avançadas, para uma maior caracterização e compreensão do sistema.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivos principais: 1) a síntese e caracterização de diferentes tipos de nanozeólitas. 2) o estudo dessas matrizes zeolíticas como suporte para imobilização de lacases derivadas de diferentes microrganismos. 3) avaliar a aplicação de enzimas livres ou imobilizadas na catálise oxidativa do glicerol TEMPO-mediada. Os objetivos gerais foram atingidos, e os dados coletados permitem as seguintes conclusões:

Os materiais zeolíticos foram preparados em escala nanométrica, conforme demonstrado pelas análises de MEV, apesar de em alguns casos aglomerados terem sido formados. O processo de troca iônica da nanozeólita faujasita X (FAU/Na⁺) resultou na formação de uma fase competidora no material FAU/Cu²⁺. Com base em dados de DRX, MEV, EDS, EDX, FTIR e MET, esta fase foi assinalada a formação do mineral antlerite, formada devido à alta temperatura do processo de troca iônica. Todos os demais suportes sintetizados com sucesso, pois os dados de caracterização estão de acordo com a literatura.

As três lacases testadas, LPO, LAB e LAsp apresentaram temperaturas ótimas acima de 60 °C e pH ótimo 3. No entanto, a estabilidade das enzimas em condições de baixo pH e altas temperaturas é bastante reduzida. Isso deve-se a potencial desnaturação destas enzimas para longos períodos de incubação.

Os materiais zeolíticos sintetizados e funcionalizados foram capazes de imobilizar as lacases testadas, entretanto, com baixa manutenção das atividades enzimáticas em comparação com a atividade das enzimas livres na oxidação de ABTS. Dentre os suportes testados, o mais efetivo foi o material contendo cobre em sua composição – FAU/Cu²⁺/APTMS/GA. Essa observação pode ser correlacionada com o potencial ativador que o cobre apresentou quando as atividades das enzimas livres foram testadas em ambientes químicos contendo concentrações variadas deste metal. Entretanto, a contribuição da fase competidora do material com cobre não foi considerada neste estudo, e pode sim estar relacionada com o resultado observado.

Apesar de terem sido obtidos complexos lacases/nanozeólitas com atividades razoáveis para a oxidação do composto ABTS, quando os complexos selecionados foram testados para a reação de oxidação do glicerol TEMPO-mediada, as conversões obtidas foram substancialmente inferiores as conversões obtidas utilizando as enzimas livres, mesmo em quantidades equivalentes de atividade. Apesar de baixas conversões, alta seletividade para

formação de gliceraldeído foi observada quando utilizados os complexos. Por outro lado, as enzimas livres LPO e LAsp altas conversões em comparação com os complexos. No entanto, a enzima LPO se destacou, com conversão superior a 80%, enquanto a LAsp apresentou conversão por volta de 30%. Essa diferença de conversão pode ser relacionada ao potencial redutor de cada enzima, enquanto a LAsp tem potencial redutor da ordem de 0,53 V vs. NHE, e LPO tem potencial redox de 0,74 V. Isso permite concluir que o potencial redutor deve ser levado em consideração para a aplicação de lacases no sistema proposto, e enzimas de maior potencial são mais indicadas. Além disso, é a primeira vez que as lacases LPO, LAsp e LAB são empregadas neste sistema, tanto em forma livre como imobilizada, e tanto LPO quanto LAsp apresentaram conversões comparativas ou superiores as lacases investigadas anteriormente em outros estudos.

Os dados de ressonância paramagnética eletrônica indicaram uma alta dependência da lacase LAsp ao pH do meio, e sugerem que os pH dos microambientes enzimáticos após imobilização são próximos ao pH neutro. Os Hamiltonianos de spin obtidos a partir de simulações dos espectros de EPR indicaram variação na coordenação do cobre T2 do sítio catalítico da lacase quando o pH do meio foi alterado de 4,5 para 7, e os valores obtidos para enzima livre em pH 7 são aproximadamente os mesmos da enzima imobilizada nos diferentes suportes. Isso pode ter contribuído para a redução da atividade enzimática quando comparada com a enzima livre em pH ácido. Estas observações estão de acordo os dados de caracterização enzimática coletados, em que a atividade enzimática foi altamente dependente do pH.

Em geral, os dados permitem concluir que materiais zeolíticos tem sim potencial para imobilização de lacases. No entanto, uma caracterização prévia das propriedades físico-químicas dos suportes e das enzimas é altamente recomendada para o direcionamento na busca pela combinação correta de suporte com lacase. Os pH dos microambientes enzimáticos após imobilização devem ser investigados, e o potencial redutor destas enzimas considerados, para efetiva aplicação no sistema proposto: oxidação do glicerol lacase/TEMPO-mediada.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomenda-se as seguintes etapas:

- i. A verificação dos sítios ácidos de Brønsted/Lewis dos materiais zeolíticos testados neste estudo, ou outros suportes zeolíticos, considerando a existência de um número enorme de zeólitas com diferentes estruturas e propriedades físico-químicas.
- ii. A modulação da acidez da superfície zeolítica na tentativa de deixar este tipo de material mais adequado para imobilização de lacases. E a busca por um protocolo de determinação do pH dos microambientes enzimáticos após imobilização.
- iii. Cálculos termodinâmicos dos sítios catalíticos das enzimas lacases (estudos não-miméticos) para otimização das reações de oxidação do glicerol.
- iv. Imobilização de lacases em estruturas zeolíticas hierarquicamente estruturadas.
- v. Verificação do grau de contaminação por Fe (III). Se possível tentar reduzir ao máximo a presença deste contaminante, visando espectros de EPR mais limpos e resolvidos.
- vi. Ampliação dos estudos espectroscópicos e eletroquímicos para as lacases de LPO e LAB. O teste de lacases de outros organismos é recomendado também, principalmente lacases de alto potencial redutor.
- vii. A busca por um protocolo alternativo de seleção dos complexos lacase/zeólitas. O protocolo utilizando ABTS pode não ser o mais adequado, como ilustrado neste trabalho. Sugere-se a investigação eletroquímica direta do mediador TEMPO, possivelmente pela modificação de um eletrodo de carbono e montagem de uma plataforma que permita a investigação da conversão direta de TEMPO em TEMPO⁺. Uma vez que TEMPO é utilizado para a oxidação do glicerol, seria conveniente selecionar um complexo com alta atividade para este mediador.
- viii. Uma sugestão extra é a aplicação de engenharia genética na busca por enzimas mais estáveis em pH ácido por mutação sítio dirigida. Apesar de lacases em geral terem ótimos reacionais em pH ácido, a estabilidade para longos períodos de incubação destas enzimas é baixa, e limita sua aplicação em sistemas catalíticos de reações lentas, como o deste estudo.

REFERÊNCIAS

- 1 MARTIN, G. R. **A clash of kings**. Bantam, 2012. ISBN 0345535413.
- 2 FAIRBANKS, M. Glicerina: Crescimento do biodiesel provoca inundação no mercado de glicerina, incentivando a descobrir novas aplicações. **Revista Química e Derivados**, n. 487, 2009.
- 3 ZHOU, C.-H. C. et al. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 3, p. 527-549, 2008.
- 4 CHHEDA, J. N.; HUBER, G. W.; DUMESIC, J. A. Liquid-phase catalytic processing of biomass-derived oxygenated hydrocarbons to fuels and chemicals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 38, p. 7164-7183, 2007.
- 5 BERNATCHEZ, J. A. et al. Derivatives of mesoxalic acid block translocation of HIV-1 reverse transcriptase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 3, p. 1474-1484, 2015.
- 6 GABBARA, S. et al. Inhibitors of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. **Biochemistry**, v. 38, n. 40, p. 13070-13076, 1999.
- 7 DAVIS, W. R. et al. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-catalyzed DNA strand transfer reactions by 4-chlorophenylhydrazone of mesoxalic acid. **Biochemistry**, v. 39, n. 46, p. 14279-14291, 2000.
- 8 BEHR, A. et al. Improved utilisation of renewable resources: new important derivatives of glycerol. **Green Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 13-30, 2008.
- 9 FORDHAM, P.; BESSON, M.; GALLEZOT, P. Catalytic oxidation with air of tartronic acid to mesoxalic acid on bismuth-promoted platinum. **Catalysis letters**, v. 46, n. 3-4, p. 195-199, 1997.
- 10 FORDHAM, P.; BESSON, M.; GALLEZOT, P. Selective oxidation with air of glyceric to hydroxypyruvic acid and tartronic to mesoxalic acid on PtBi/C catalysts. **Studies in surface science and catalysis**, v. 108, p. 429-436, 1997.
- 11 CIRIMINNA, R.; PAGLIARO, M. Oxidation of tartronic acid and dihydroxyacetone to sodium mesoxalate mediated by TEMPO. **Tetrahedron letters**, v. 45, n. 34, p. 6381-6383, 2004.
- 12 JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26, n. 4, p. 338-348, 2007.
- 13 VILLA, A. et al. Glycerol Oxidation Using Gold-Containing Catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 5, p. 1403-1412, 2015/05/19 2015.

- ¹⁴ DODEKATOS, G.; SCHÜNEMANN, S.; TÜYSÜZ, H. Recent advances in thermo-, photo-, and electrocatalytic glycerol oxidation. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 7, p. 6301-6333, 2018.
- ¹⁵ HONG, C. S. et al. Enzymatic Conversion of Glycerol to Glyceric Acid with Immobilised Laccase in Na-Alginate Matrix. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 632-639, 2015.
- ¹⁶ LIEBMINGER, S.; SIEBENHOFER, M.; GUEBITZ, G. Oxidation of glycerol by 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in the presence of laccase. **Bioresource technology**, v. 100, n. 20, p. 4541-4545, 2009.
- ¹⁷ HONG, C. S. et al. A comparison of entrapped and covalently bonded laccase: Study of its leakage, reusability, and the catalytic efficiency in TEMPO-mediated glycerol oxidation. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-10, 2017.
- ¹⁸ HONG, C. S. et al. Selective oxidation of glycerol to mesoxalic acid by laccase/2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl system: Effect of process conditions and the kinetic modeling. **Chemical Engineering Communications**, v. 206, n. 12, p. 1645-1660, 2019.
- ¹⁹ GONCALVES, A. P. V. et al. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 2, p. 93-101, Feb 1 1997.
- ²⁰ GONCALVES, A. P. V. et al. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 1, n. 2, p. 53-60, Apr 4 1996.
- ²¹ SERRALHA, F. N. et al. Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 4, n. 5-6, p. 303-311, Aug 3 1998.
- ²² KANG, Y. J. et al. Uniform nanozeolite microspheres with large secondary pore architecture. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 7, p. 1861-1866, Apr 4 2006.
- ²³ ZHANG, Y. H. et al. Enrichment of low-abundance peptides and proteins on zeolite nanocrystals for direct MALDI-TOF MS analysis. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 4, p. 615-617, 2005 2005.
- ²⁴ YU, T. et al. Controlled nanozeolite-assembled electrode: Remarkable enzyme-immobilization ability and high sensitivity as biosensor. **Chemistry-a European Journal**, v. 12, n. 4, p. 1137-1143, Jan 23 2006.
- ²⁵ JI, J. et al. Enhanced protein digestion through the confinement of nanozeolite-assembled microchip reactors. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 2457-2463, Apr 1 2008.

- 26 DE VASCONCELLOS, A. et al. Potential new biocatalysts for biofuel production: the fungal lipases of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolitic supports ion exchanged with transition metals. **Microporous and Mesoporous Materials**, 2015.
- 27 DE VASCONCELLOS, A. et al. Biocatalysts based on nanozeolite-enzyme complexes: effects of alkoxysilane surface functionalization and biofuel production using microalgae lipids feedstock. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2018.
- 28 TOSHEVA, L.; VALTCHEV, V. P. Nanozeolites: Synthesis, crystallization mechanism, and applications. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 10, p. 2494-2513, May 17 2005.
- 29 MA, F. R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, Oct 1999.
- 30 MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Percentual obrigatório de biodiesel sobe para 12%. 2020. Acesso em: 26 de Agosto.
- 31 SONNATI, M. O. et al. Glycerol carbonate as a versatile building block for tomorrow: synthesis, reactivity, properties and applications. **Green Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 283-306, 2013.
- 32 DEVAUX, J.-F.; FAUCONET, M.; TLILI, N. **Method for producing acrolein and/or acrylic acid from glycerol**: Google Patents 2013.
- 33 CHIEREGATO, A. et al. Glycerol oxidehydration into acrolein and acrylic acid over W–V–Nb–O bronzes with hexagonal structure. **Catalysis Today**, v. 197, n. 1, p. 58-65, 2012.
- 34 CHIEREGATO, A. et al. One-pot glycerol oxidehydration to acrylic acid on multifunctional catalysts: Focus on the influence of the reaction parameters in respect to the catalytic performance. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 150–151, p. 37-46, 5/5/ 2014.
- 35 PESTANA, C. F. M. et al. Oxidative dehydration of glycerol to acrylic acid over vanadium-impregnated zeolite beta. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 100-105, 2013.
- 36 KATRYNIOK, B. et al. Glycerol dehydration to acrolein in the context of new uses of glycerol. **Green Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 2079-2098, 2010.
- 37 BELTRÁN-PRIETO, J. C.; KOLOMAZNÍK, K.; PECHA, J. A Review of Catalytic Systems for Glycerol Oxidation: Alternatives for Waste Valorization. **Australian Journal of Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 511-521, 2013.
- 38 HE, Z. et al. Selective oxidation of glycerol over supported noble metal catalysts. **Catalysis Today**, 2020.

- 39 KATRYNIOK, B. et al. Selective catalytic oxidation of glycerol: perspectives for high value chemicals. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1960-1979, 2011.
- 40 CIRIMINNA, R.; PAGLIARO, M. One-Pot Homogeneous and Heterogeneous Oxidation of Glycerol to Ketomalonic Acid Mediated by TEMPO. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 345, n. 3, p. 383-388, 2003.
- 41 CHANG, P. S. et al. Physicochemical Properties of Partially Oxidized Corn Starch from Bromide-Free TEMPO-Mediated Reaction. **Journal of food science**, v. 73, n. 3, p. C173-C178, 2008.
- 42 BRAGD, P. L.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H. Bromide-free TEMPO-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl α -d-glucopyranoside. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 3, p. 355-363, 9/22/ 2000.
- 43 TALEBIAN-KIAKALAIIEH, A. et al. Oxidation of bio-renewable glycerol to value-added chemicals through catalytic and electro-chemical processes. **Applied Energy**, v. 230, p. 1347-1379, 2018.
- 44 GÄTGENS, C. et al. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 3, p. 553-559, 2007.
- 45 ZHENG, M.; ZHANG, S. Immobilization of glycerol dehydrogenase on magnetic silica nanoparticles for conversion of glycerol to value-added 1, 3-dihydroxyacetone. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, n. 6, p. 278-287, 2011.
- 46 THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.
- 47 MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.
- 48 CRESTINI, C.; JURASEK, L.; ARGYROPOULOS, D. S. On the mechanism of the laccase–mediator system in the oxidation of lignin. **Chemistry-A European Journal**, v. 9, n. 21, p. 5371-5378, 2003.
- 49 DESAI, S. S.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: a review. **Asian J Biotechnol**, v. 3, n. 2, p. 98-124, 2011.
- 50 JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 5, p. 869-883, 2015.
- 51 XU, F. et al. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase axial perturbations of the T1 copper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 18, p. 12372-12375, 1999.
- 52 XU, F. et al. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. **Biochemical Journal**, v. 334, n. 1, p. 63-70, 1998.

- 53 XU, F. et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 2, p. 303-311, 1996.
- 54 BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D.; KEPP, K. P. TtMCO: A highly thermostable laccase-like multicopper oxidase from the thermophilic *Thermobaculum terrenum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 59-65, 2015.
- 55 SOSNA, M. et al. Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 34, p. 10018-10026, 2010.
- 56 MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 25-40, 2015.
- 57 FABBRINI, M. et al. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 43, p. 7551-7553, 2001.
- 58 FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 5, p. 231-240, 2002.
- 59 GREEN, R. A. et al. A voltammetric study of the 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) mediated oxidation of benzyl alcohol in tert-butanol/water. **Electrochimica Acta**, v. 113, p. 550-556, 2013
- 60 ESHTAYA, M. et al. Developing energy efficient lignin biomass processing—towards understanding mediator behaviour in ionic liquids. **Faraday discussions**, v. 190, p. 127-145, 2016.
- 61 SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.
- 62 FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 12// 2013.
- 63 SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.
- 64 LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.
- 65 FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S. et al. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, p. 101-108, 3/23/ 2006.

- 66 MACARIO, A. et al. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2-4, p. 328-335, 2007.
- 67 KUDANGA, T. et al. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 3, p. 195-208, 2011.
- 68 HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3, p. 330-336, 2000.
- 69 JOLIVALT, C. et al. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 103-113, 2000.
- 70 SILVA, C. et al. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6, 6 fibres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6, p. 867-875, 2007.
- 71 GEORGIEVA, S. et al. Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, n. 3, p. 177-184, 2008.
- 72 REKUĆ, A. et al. Very stable silica-gel-bound laccase biocatalysts for the selective oxidation in continuous systems. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2076-2083, 2010.
- 73 BAUTISTA, L. F.; MORALES, G.; SANZ, R. Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8541-8548, 2010.
- 74 WANG, F. et al. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance. **Bioresource technology**, v. 101, n. 23, p. 8931-8935, 2010.
- 75 REKUĆ, A. et al. Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 191-198, 2009.
- 76 SALIS, A. et al. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1, p. 175-180, 2009.
- 77 TAGHIZADEH, T. et al. Biodegradation of bisphenol A by the immobilized laccase on some synthesized and modified forms of zeolite Y. **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, p. 121950, 2020.

- 78 CELIKBICAK, O. et al. Immobilization of laccase on hairy polymer grafted zeolite particles: Degradation of a model dye and product analysis with MALDI–ToF-MS. **Microporous and mesoporous materials**, v. 199, p. 57-65, 2014.
- 79 WEHAIDY, H. R. et al. Nanoporous Zeolite-X as a new carrier for laccase immobilization and its application in dyes decolorization. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 19, p. 101135, 2019.
- 80 NASERI, M. et al. Lipase and Laccase Encapsulated on Zeolite Imidazolate Framework: Enzyme Activity and Stability from Voltammetric Measurements. **ChemCatChem**, v. 10, n. 23, p. 5425-5433, 2018.
- 81 BRECK, D. W. Zeolite molecular sieves: structure. **Chemistry and Use, Wiley, New York**, v. 636, 1974.
- 82 BRECK, D. W. **Zeolite molecular sieves**. Krieger, 1984. ISBN 0898746485.
- 83 BEKKUM, H. V.; JANSEN, J. C.; FLANIGEN, E. M. Introduction to zeolite science and practice. 1991.
- 84 MEIER, W. M. Zeolite structures. **Molecular sieves**, p. 10-27, 1968.
- 85 BAERLOCHER, C.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. **Atlas of zeolite framework types**. Elsevier, 2007.
- 86 GHOBARKAR, H.; SCHÄF, O.; GUTH, U. Zeolites—from kitchen to space. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 27, n. 2–4, p. 29-73, // 1999.
- 87 WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. **Solid State Ionics**, v. 131, n. 1–2, p. 175-188, 6/1/ 2000.
- 88 ZHAN, B. Z. et al. Control of particle size and surface properties of crystals of NaX zeolite. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 9, p. 3636-3642, Sep 2002.
- 89 VALTCHEV, V. P.; FAUST, A.-C.; LÉZERVANT, J. Rapid synthesis of silicalite-1 nanocrystals by conventional heating. **Microporous and mesoporous materials**, v. 68, n. 1, p. 91-95, 2004.
- 90 PÉREZ-RAMÍREZ, J. et al. Hierarchical zeolites: enhanced utilisation of microporous crystals in catalysis by advances in materials design. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 11, p. 2530-2542, 2008.
- 91 CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: History and development from the earliest days to the present time. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 663-701, Mar 2003.
- 92 MAHMOODI, N. M.; SAFFAR-DASTGERDI, M. H.; HAYATI, B. Environmentally friendly novel covalently immobilized enzyme bionanocomposite: From synthesis to the destruction of pollutant. **Composites Part B: Engineering**, v. 184, p. 107666, 2020.

- 93 ZHAN, B. Z. et al. A novel, organic-additive-free synthesis of nanometer-sized NaX crystals. **Chemical Communications**, n. 13, p. 1176-1177, 2001 2001.
- 94 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites Part II: Preparation, characterisation and properties of colloidal silicalite-1, TS-1, silicalite-2 and TS-2. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 72, n. 1-3, p. 67-80, Jul 8 2004.
- 95 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O.; PLAISTED, R. J. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites. Part 1: synthesis of colloidal silicalite-1 and titanosilicalite-1 (TS-1). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 66, n. 2-3, p. 143-156, Dec 5 2003.
- 96 BIEMMI, E.; BEIN, T. Assembly of Nanozeolite Monolayers on the Gold Substrates of Piezoelectric Sensors. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 11196-11202, 2008/10/07 2008.
- 97 JAFARI, M. et al. Investigations on hydrothermal synthesis parameters in preparation of nanoparticles of LTA zeolite with the aid of TMAOH. **Powder technology**, v. 237, p. 442-449, 2013.
- 98 LARLUS, O. et al. A powerful structure-directing agent for the synthesis of nanosized Al- and high-silica zeolite Beta in alkaline medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 142, n. 1, p. 17-25, Jun 2011.
- 99 NERY, J. G.; MASCARENHAS, Y. P.; CHEETHAM, A. K. A study of the highly crystalline, low-silica, fully hydrated zeolite P ion exchanged with (Mn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺) cations. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 57, n. 3, p. 229-248, Feb 4 2003.
- 100 MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, v. 37, n. 5, p. 790-802, 2004.
- 101 DAVID, A. E. et al. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 395-407, Sep 18 2006.
- 102 CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. D.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.
- 103 BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976.
- 104 YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, n. 1-3, p. 262-267, Nov 2007.

- 105 NIKU-PAAVOLA, M. L.; RAASKA, L.; ITÄVAARA, M. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. **Mycological Research**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1990.
- 106 UMAMAHESWARI, V. et al. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopic Study of Ascorbate Oxidase Immobilized on Mesoporous Silica Materials. **Advanced Porous Materials**, v. 5, n. 2, p. 113-121, 2017.
- 107 VAN GRIEKEN, R. et al. Anomalous crystallization mechanism in the synthesis of nanocrystalline ZSM-5. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 39, n. 1, p. 135-147, 2000.
- 108 MAJANO, G. et al. Zeolite Beta nanosized assemblies. **Microporous and mesoporous materials**, v. 80, n. 1, p. 227-235, 2005.
- 109 SHIRAZI, L.; JAMSHIDI, E.; GHASEMI, M. R. The effect of Si/Al ratio of ZSM-5 zeolite on its morphology, acidity and crystal size. **Crystal Research and Technology**, v. 43, n. 12, p. 1300-1306, 2008.
- 110 ANGELL, C. L.; SCHAFFER, P. C. Infrared Spectroscopic Investigations of Zeolites and Adsorbed Molecules. I. Structural OH Groups¹. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 3463-3470, 1965.
- 111 KANTAM, M. L. et al. Synthesis of nanocrystalline zeolite beta in supercritical fluids, characterization and catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 252, n. 1-2, p. 76-84, 6/1/ 2006.
- 112 HU, L. et al. Phase selection controlled by sodium ions in the synthesis of FAU/LTA composite zeolite. **Science and technology of advanced materials**, v. 10, n. 1, p. 015001, 2009.
- 113 ALFARO, S. et al. Aging time effect on the synthesis of small crystal LTA zeolites in the absence of organic template. **Materials Letters**, v. 61, n. 23, p. 4655-4658, 2007.
- 114 PIRUTKO, L. V. et al. Preparation and catalytic study of metal modified TS-1 in the oxidation of benzene to phenol by N₂O. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 48, n. 1-3, p. 345-353, Nov 1 2001.
- 115 FLANIGEN, E. M.; KHATAMI, H.; SZYMANSKI, H. A. Infrared structural studies of zeolite frameworks. In: (Ed.): ACS Publications, 1971.
- 116 AZIZI, S. N.; DEHNAVI, A. R.; JOORABDOOZHA, A. Synthesis and characterization of LTA nanozeolite using barley husk silica: Mercury removal from standard and real solutions. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 5, p. 1753-1759, 5// 2013.
- 117 THUADAIJ, P.; NUNTIYA, A. Effect of the SiO₂/Al₂O₃ ratio on the synthesis of Na-x zeolite from Mae Moh fly ash. **Scienceasia**, v. 38, n. 3, p. 295-300, Sep 2012.

- 118 VALTCHEV, V. P.; BOZHILOV, K. N. Transmission electron microscopy study of the formation of FAU-type zeolite at room temperature. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 40, p. 15587-15598, 2004.
- 119 AZIZI, S. N.; GHASEMI, S.; KAVIAN, S. Synthesis and characterization of NaX nanozeolite using stem sweep as silica source and application of Ag-modified nanozeolite in electrocatalytic reduction of H₂O₂. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 62, p. 1-7, Dec 15 2014.
- 120 THANGARAJ, A. et al. Catalytic properties of crystalline titanium silicalites I. Synthesis and characterization of titanium-rich zeolites with MFI structure. **Journal of Catalysis**, v. 130, n. 1, p. 1-8, 1991.
- 121 BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology letters**, v. 206, n. 1, p. 69-74, 2002.
- 122 MURUGESAN, K. et al. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 1, p. 523-529, 2009.
- 123 MUKHOPADHYAY, A.; DASGUPTA, A. K.; CHAKRABARTI, K. Thermostability, pH stability and dye degrading activity of a bacterial laccase are enhanced in the presence of Cu₂O nanoparticles. **Bioresource technology**, v. 127, p. 25-36, 2013.
- 124 SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource technology**, v. 128, p. 49-57, 2013.
- 125 SHERRY, H. S. The ion-exchange properties of zeolites. I. Univalent ion exchange in synthetic faujasite. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 1158-1168, 1966.
- 126 YANG, S. et al. Competition of FAU and LTA in the synthesis system (TMA, Na)₂O–Al₂O₃–SiO₂–H₂O. **Microporous and mesoporous materials**, v. 87, n. 3, p. 261-267, 2006.
- 127 VERBOEKEND, D. et al. Hierarchical FAU-and LTA-Type Zeolites by Post-Synthetic Design: A New Generation of Highly Efficient Base Catalysts. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 15, p. 1923-1934, 2013.
- 128 BRANDENBURG, K.; PUTZ, H. Match: Phase identification from powder diffraction. **User Manual, version**, v. 1, p. 2003-2009, 2003.
- 129 IMPACT, C. **Match! Phase Identification from Powder Diffraction** 2014.
- 130 ZITTLAU, A. H. et al. Thermodynamics of the basic copper sulfates antlerite, posnjakite, and brochantite. **Chemie der Erde-Geochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39-50, 2013.

- 131 SEGAL, E.; PERELSHTEIN, I.; GEDANKEN, A. A novel sonochemical synthesis of antlerite nanorods. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 22, p. 30-34, 2015.
- 132 BHAWE, Y. I: Materials for thermochemical water splitting. II: Structure-property relations for the zeolite catalyzed conversion of methanol to light olefins. 2013.
- 133 LONG, N. Q. et al. Preparation, characterization and h₂s adsorptive removal of ion-exchanged zeolite x. **Asean Engineering Journal Part B**, Vol 5, No 1, 2016.
- 134 PANDYA, P. H. et al. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 77, n. 1, p. 67-77, 1/3/ 2005.
- 135 SELVASEKARAPANDIAN, S. et al. Laser Raman and FTIR studies on Li⁺ interaction in PVAc-LiClO₄ polymer electrolytes. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, n. 5, p. 1234-1240, Dec 2006.
- 136 ZHOU, C. et al. Facile synthesis of zeolite FAU molecular sieve membranes on bio-adhesive polydopamine modified Al₂O₃ tubes. **Journal of Membrane Science**, v. 494, p. 174-181, 2015.
- 137 SU, F. et al. Adsorption of CO₂ on amine-functionalized Y-type zeolites. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 2, p. 1441-1448, 2010.
- 138 LIU, L. et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6, p. 426-433, 2009.
- 139 ZHILIN, L. et al. Immobilization of Agaricus Bisporus Laccase on Ceramic-Chitosan Composite Support and Their Properties: Potential for Oily Wastewater Treatment. **CHINA PETROLEUM PROCESSING & PETROCHEMICAL TECHNOLOGY**, v. 18, n. 4, p. 51-60, 2016.
- 140 TONIN, F. et al. Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. **New biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 387-398, 2016.
- 141 LLORET, L. et al. Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor. **Biodegradation**, v. 23, n. 3, p. 373-386, 2012.
- 142 LLORET, L. et al. Immobilization of laccase by encapsulation in a sol-gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 6, p. 1570-1579, 2011.
- 143 MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 5/2/ 2007.

- 144 FORTES, C. C. S. et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 117, p. 1-8, 2017.
- 145 ANWAR, M. Z. et al. SnO₂ hollow nanotubes: a novel and efficient support matrix for enzyme immobilization. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15333, 2017.
- 146 BELTRÁN-PRIETO, J. C. et al. Development of an HPLC method for the determination of glycerol oxidation products. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 19, p. 2758-2773, 2013.
- 147 BROGIONI, B. et al. Characterization of radical intermediates in laccase-mediator systems. A multifrequency EPR, ENDOR and DFT/PCM investigation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 48, p. 7284-7292, 2008.
- 148 CIRIMINNA, R. et al. One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 39, p. 6993-6995, 9/25/ 2006.
- 149 SHLEEV, S. et al. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 1, p. 115-124, 2005.
- 150 KUNAMNENI, A. et al. Laccases and their applications: a patent review. **Recent patents on biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 10-24, 2008.
- 151 FRASCONI, M. et al. Electrochemical evaluation of electron transfer kinetics of high and low redox potential laccases on gold electrode surface. **Electrochimica acta**, v. 56, n. 2, p. 817-827, 2010.
- 152 SALIH, F. E. et al. Electrochemical sensor based on low silica X zeolite modified carbon paste for carbaryl determination. **Journal of advanced research**, v. 8, n. 6, p. 669-676, 2017.
- 153 MAICANEANU, A. et al. Physical-chemical and electrochemical characterization of Fe-exchanged natural zeolite applied for obtaining of hydrogen peroxide amperometric sensors. **Chemie der Erde-Geochemistry**, v. 74, n. 4, p. 653-660, 2014.
- 154 ZHANG, R. et al. Zeolite-encapsulated M (Co, Fe, Mn)(SALEN) complexes modified glassy carbon electrodes and their application in oxygen reduction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 643, n. 1-2, p. 31-38, 2010.
- 155 HE, P. et al. Zeolite A functionalized with copper nanoparticles and graphene oxide for simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid. **Analytica chimica acta**, v. 739, p. 25-30, 2012.
- 156 CARVALHO, R. et al. Electro-oxidation of phenol on a new type of zeolite/graphite biocomposite electrode with horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 278, n. 1-2, p. 47-52, 2007.

- 157 DONG, J. et al. Reagentless amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on a ferrocene@ NaY zeolite composite. **Microchimica Acta**, v. 174, n. 3-4, p. 281-288, 2011.
- 158 ZHOU, X. et al. Nanozeolite-assembled interface towards sensitive biosensing. **Electrochemistry communications**, v. 9, n. 7, p. 1525-1529, 2007.
- 159 KIRDECILER, S. K. et al. A novel urea conductometric biosensor based on zeolite immobilized urease. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1435-1441, 2011.
- 160 NOROOZIFAR, M. et al. Simultaneous and sensitive determination of a quaternary mixture of AA, DA, UA and Trp using a modified GCE by iron ion-doped natrolite zeolite-multiwall carbon nanotube. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 56-63, 2011.
- 161 YU, T. et al. Controlled Nanozeolite-Assembled Electrode: Remarkable Enzyme-Immobilization Ability and High Sensitivity as Biosensor. **Chemistry–A European Journal**, v. 12, n. 4, p. 1137-1143, 2006.
- 162 LIU, E.; ZHANG, X. Electrochemical sensor for endocrine disruptor bisphenol A based on a glassy carbon electrode modified with silica and nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 6, n. 21, p. 8604-8612, 2014.
- 163 LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.-E. L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.
- 164 ZHILINSKAYA, E. A. et al. EPR investigation of Fe-exchanged beta-zeolites. **Langmuir**, v. 19, n. 9, p. 3596-3602, 2003.
- 165 DZWIGAJ, S. et al. Effect of iron impurities on the catalytic activity of BEA, MOR and MFI zeolites in the SCR of NO by ethanol. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 86, n. 1-2, p. 45-52, 2009.
- 166 POGNI, R. et al. Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 5, p. 885-896, 2015.
- 167 RIBEIRO, L. F. et al. Engineering bifunctional laccase-xylanase chimeras for improved catalytic performance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43026-43038, 2011.
- 168 GUPTA, A. et al. Involvement of Tyr108 in the enzyme mechanism of the small laccase from *Streptomyces coelicolor*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 44, p. 18213-18216, 2012.

- 169 MOT, A. C. et al. “Yellow” laccase from *Sclerotinia sclerotiorum* is a blue laccase that enhances its substrate affinity by forming a reversible tyrosyl-product adduct. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0225530, 2020.
- 170 SILVA, D. S. A. et al. Tuning the Brønsted and Lewis acid nature in HZSM-5 zeolites by the generation of intracrystalline mesoporosity—Catalytic behavior for the acylation of anisole. **Molecular Catalysis**, v. 492, p. 111026, 2020.
- 171 LI, S. et al. Brønsted/Lewis acid synergy in dealuminated HY zeolite: a combined solid-state NMR and theoretical calculation study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 36, p. 11161-11171, 2007.
- 172 BONOMO, R.; CASTRONOVO, B.; SANTORO, A. A spectroscopic investigation of the interaction between nitrogen monoxide and copper sites of the fungal laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Dalton Transactions**, n. 1, p. 104-112, 2004.
- 173 BERTRAND, P. **Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Applications**. Springer Nature, 2020.
- 174 BENNETT, B.; KOWALSKI, J. M. EPR methods for biological Cu (II): L-band CW and NARS. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, v.563, 2015. p.341-361.
- 175 LI, H. et al. Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 25, p. 8010-8019, 2004.
- 176 ERNST, H. A. et al. A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0206589, 2018.
- 177 PEISACH, J.; BLUMBERG, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 165, n. 2, p. 691-708, 1974.
- 178 ZUMARRAGA, M. et al. Combinatorial Saturation Mutagenesis of the *Myceliophthora thermophila* Laccase T2 Mutant: the Connection between the C-Terminal Plug and the Conserved. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 11, n. 10, p. 807-816, 2008.
- 179 PALMER, A. E. et al. Spectroscopic characterization of the Leu513His variant of fungal laccase: effect of increased axial ligand interaction on the geometric and electronic structure of the type 1 Cu site. **Inorganic chemistry**, v. 42, n. 13, p. 4006-4017, 2003.
- 180 SHLEEV, S. V. et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 693-703, 2004.
- 181 SHLEEV, S. et al. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 3, p. 745-754, 2005.

- ¹⁸² LI, X. et al. An electrochemical method for investigation of conformational flexibility of active sites of *trametes versicolor* laccase based on sensitive determination of copper ion with cysteine-modified electrodes. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 21, p. 9416-9421, 2012.
- ¹⁸³ REINHAMMAR, B. R. M. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 275, n. 2, p. 245-259, 1972.