

## SISTEME BIOCATALITICE PENTRU SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR BIODERIVAȚI SUSTENABILI

### Teză de doctorat – Rezumat

pentru obținerea titlului științific de doctor la

Universitatea Politehnică Timișoara

în domeniul de doctorat Inginerie Chimică

**autor ing. Ioan Bîțcan**

conducător științific Prof.univ.dr.ing. Francisc PETER

luna 09 anul 2023

Utilizarea enzimelor pentru obținerea bioderivaților reprezintă la ora actuală o direcție importantă a chimiei verzi, datorită potențialului ridicat de utilizare al acestor compuși în diferite domenii precum cel farmaceutic, medical, cosmetic sau alimentar [1].

În ultimii ani, interesul pentru biocataliză s-a extins în tot domeniul chimiei verzi, având ca scop realizarea de procese industriale cu impact redus asupra mediului.

Principalul obiectiv al tezei de doctorat a fost dezvoltarea de metode sustenabile pentru sinteza unor noi poliesteri, dar și a unor posibili monomeri, folosind materii prime regenerabile în diferite combinații.

Teza de doctorat este structurată în patru părți:

**1. Studiu de literatură**, în care este detaliat stadiul actual al cercetării în domeniul sintezei biopolimerilor utilizând enzime ca și catalizatori.

**2. Contribuții originale**, în care sunt prezentate rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor, debutează cu prezentarea obiectivelor tezei de doctorat. Teza de doctorat este focalizată pe dezvoltarea și testarea unor sisteme biocatalitice de obținere a unor bioderivați de natură monomerică sau poliestică utilizând materii prime regenerabile. Pornindu-se de la principiile chimiei verzi și avantajele cunoscute ale catalizatorilor enzimatici pentru a obține noi bioderivați, compuși cu multiple utilizări în diverse domenii, teza a avut ca obiectiv general investigarea căilor de sinteză pentru obținerea acestor produși, în strânsă legătură cu criteriile de sustenabilitate ce guvernează dezvoltarea actuală a bioeconomiei.

### **Studii computaționale asupra lipazelor din diferite surse microbiene.**

În cadrul acestui capitol au fost utilizate diferite metode computaționale pentru a evalua: efectul parametrilor fizici de reacție (temperatura și presiunea) asupra structurii tridimensionale și asupra suprafețelor a două lipaze microbiene disponibile comercial; și interacțiunile acestor lipaze cu diferite substraturi oligoesterice ecologice, alifatică și aromatică.

Scopul acestor metode de modelare moleculară și andocare a fost de a oferi o predicție a schimbărilor conformației proteinelor și implicit a situsului activ pe care le suferă enzimele atunci când sunt utilizate în condiții diferite de reacție.

## **Biotransformarea uleiului de ricin în oligomeri nesaturați cu unități furanice prin metoda „one-pot”, utilizând lipaze native și imobilizate**

În cadrul acestui subcapitol s-a realizat optimizarea sintezei enzimatică a unor noi compuși oligomerici utilizând ulei de ricin și acid 5-hidroximetil-2-furancarboxilic. Ca biocatalizatori a fost utilizată lipaza din *Pseudomonas stutzeri*. Trebuie evidențiat faptul că materiile prime utilizate au fost de origine vegetală, utilizarea lor îndeplinind toate cerințele chimiei verzi. Sistemul de reacție studiat a fost de tip „one-pot” în cascadă, în care s-a pornit de la ulei de ricin și folosind o singură lipază s-au realizat atât hidroliza acestui ulei cât și transformarea RCA obținut în oligoesteri.

Analiza structurală, demonstrarea formării copolimerului și a compoziției acestuia s-au realizat folosind tehnici instrumentale pretențioase, ca 2D-RMN și MALDI-TOF MS dar și FT-IR.

Analiza RMN a confirmat structura produșilor de reacție și a oferit informații relevante privind reactivitatea și regioselectivitatea reacțiilor, iar analiza termică a confirmat stabilitatea ridicată a terpolimerului, ceea ce îl face disponibil pentru diverse aplicații.

După caracterizarea avansată a produșilor de reacție a fost testată capacitatea acestora de formare a organogelurilor în diferiți solvenți organici. Caracterizarea organogelurilor s-a realizat prin determinarea vâscozității dar și prin analiza morfologică prin microscopie electronică de baleiaj.

## **Sinteza enzimatică și caracterizarea unor oligoesteri ai acidului adipic cu dioli alifatici, ciclici, sau aromatici**

Deși CaLB s-a dovedit a fi un catalizator eficient pentru transformarea unei game largi de substraturi cu grupări funcționale alifactice în poliesteri (de ex. poliesteri cu funcțiuni vinil sau hidroxi), pentru lipaza din *Ps. stutzeri* nu există studii sistematice pentru evaluarea unei asemenea activități. În cazul CaLB studiile au fost orientate mai ales spre obținerea de poliesteri derivați din monomeri regenerabili, de exemplu acizii 2,5-furandicarboxilic, adipic sau succinic și 1,4-butandiolul [2].

În cadrul acestui capitol s-a evaluat selectivitatea lipazelor CaLB și din *Ps. stutzeri* pentru 15 dioli disponibili comercial în reacția de policondensare cu acidul adipic, folosind ca mediu de reacție un solvent organic verde (ecologic) sau în sistem fără solvent. Reacțiile au fost efectuate la 2 temperaturi 50 și 75/80°C iar reacțiile au fost monitorizate prin cromatografie de permeație în gel.

Caracterizarea produșilor de reacție s-a realizat prin diferite tehnici cromatografice, spectrometrie de masă, spectroscopie RMN și analiza termică TG și DSC.

Aceste rezultate au fost publicate în revista Sustainable Chemistry and Pharmacy [3].

## **Evaluarea impactului ecologic al unor oligoesteri obținuți pe cale enzimatică: studii de biodegradare în medii lichide cu apă dulce și apă sărată**

Degradarea polimerilor este un proces care aduce modificări ale proprietăților (de ex., formă, culoare, rezistență la tracțiune) prin favorizarea unor procese biologice, chimice sau fizice care au ca rezultat ruperea legăturilor și transformări chimice ulterioare. Aceste transformări includ în principal modificări chimice, ruperea legăturilor și formarea de noi grupări funcționale. Proprietățile materialelor, cum ar fi caracteristicile mecanice, electrice sau optice ale polimerilor sunt influențate de degradare. Polimerii nu se corodează precum metalele, ci suferă procese de degradare prin mai multe mijloace care ar putea fi realizate de către mediu sau de către enzime prin biodegradare.

Condițiile necesare pentru ca un poliestere să fie utilizat în aplicații cosmetice sunt biocompatibilitatea, biodegradabilitatea și non-toxicitatea. Biodegradabilitatea materialelor plastice într-un mediu lichid se referă la degradarea în apă dulce (lacuri, râuri), în apă sărată (mări, oceane) sau în nămolurile aerobe și anaerobe (tratarea apelor uzate) [4].

În cadrul acestui subcapitol s-a studiat biodegradabilitatea unor oligoesteri sintetizați în cadrul tezei de doctorat aceștia fiind: oligoesteri derivați de furan, oligoesteri alifatici dar și monomeri alifatici sau aromatici. Pentru evaluarea biodegradabilității studiile s-au efectuat utilizând dispozitivele specifice OxiTop care sunt prevăzute cu senzori ce măsoară consumul biochimic de oxigen (CBO) necesar microorganismelor aerobe să degradeze materia organică dintr-un anumit mediu. Studiul s-a realizat în medii de cultură lichide, în care s-a utilizat ca inocul apă colectată din râul Bega din Timișoara, România și apă colectată din Marea Adriatică, Italia.

### **Oxidarea enzimatică a glicerolului utilizând lacaze imobilizate prin legare covalentă.**

În cadrul acestui capitol a fost studiată oxidarea enzimatică a glicerolului. În acest sens au fost selectate patru lacaze native disponibile comercial din *Aspergillus* sp., *Trametes versicolor*, *Rhus vernicifera* și *Agaricus bisporus*, folosind cinci mediatori diferiți. Cele mai active lacaze au fost imobilizate covalent pe șase suporturi solide funcționalizate: trei matrici magnetice și trei pe bază de polimeri metacrilici cu grupări active epoxidice sau aminice (Lifetech™). În comparație cu binecunoscutele particule magnetice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, în cadrul acestui capitol au fost utilizate particule magnetice pe bază de Ni-Zn sau Ni-Zn-Co ferite spinel (MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) cu diferiți cationi metalici (M: Zn, Co, Ni). Activitatea celor 18 preparate enzimatic rezultate a fost evaluată și cei mai activi biocatalizatori, care au fost caracterizați în detaliu în ceea ce privește stabilitatea și reutilizarea, demonstrând stabilitate la depozitare, pH și stabilitate termică îmbunătățite în comparație cu enzimele native. Biocatalizatorii au fost utilizați cu succes pentru oxidarea glicerolului la 50°C, demonstrând o selectivitate ridicată pentru sinteza acidului glicerol. Aceste rezultate au fost publicate în revista *Enzyme and Microbial Technology* [5].

### **Evaluarea enantioselectivității lipazei din *Ps. stutzeri* pentru rezoluția cinetică a unui cetoalcool secundar heterociclic**

Activitatea biologică și rolul important al alcoolilor secundari enantiopuri care conțin sisteme heterociclice ca intermediari pentru sinteza medicamentelor au atras mult interes în ultimii ani. Lipazele (triacilglicerol acil hidrolaze, EC 3.1.1.3) s-au dovedit a fi biocatalizatori adecvați pentru obținerea de stereoizomeri optic puri, deoarece aceste enzime prezintă stabilitate ridicată și enantioselectivitate în solvenții organici [6].

În cadrul acestui subcapitol, 2,2'-furoinul a fost testat ca și substrat pentru rezoluția cinetică enantioselectivă catalizată de lipaze native și imobilizate. Toate reacțiile au fost efectuate la 50°C utilizând 2-metiltetrahidrofuran ca mediu de reacție și acetat de vinil ca acil donor. Excesele enantiomerice atât ale substratului, cât și ale produsului au fost determinate prin cromatografie chirală utilizând faza staționară chirală Phenomenex Lux® 5μm i-Amiloză-3. Dintre lipazele testate, lipaza din *Pseudomonas stutzeri* imobilizată prin entrapare în sol-gel prin utilizarea unui amestec binari de silani precursori (3GOPrTMOS:TMOS=1:1) a fost cel mai eficient biocatalizator din punct de vedere al stereoselectivității pentru enantiosepararea 2,2'-furoinului. Eficiența lipazei imobilizate a fost dovedită prin valorile ridicate ale conversiei substratului, exces enantiomeric (ee), după cinci cicluri de reacție.

**3. Partea experimentală**, cuprinde materialele și procedeele experimentale utilizate în sinteza derivaților dar și pentru caracterizarea enzimelor imobilizate sau în cadrul altor proceduri, precum și metodele analiză utilizate (MALDI TOF-MS, RMN, ATR FT-IR, TG, DSC, HPLC, XPS, precum și pachetul software Gromacs, Grid și Autodock).

**4. Concluzii finale și contribuții originale**, rezultate din studiile experimentale și teoretice, în conformitate cu obiectivele propuse.

Atingerea obiectivelor tezei de doctorat prin cercetările experimentale realizate a condus la următoarele concluzii:

1. Studiul de literatură, prezentat în primul capitol al tezei, a subliniat următoarele aspecte cu privire la dezvoltarea sistemelor biocatalitice pentru obținerea derivaților sustenabili:

- Biopolimerii reprezintă o soluție sustenabilă pentru înlocuirea polimerilor obținuți din materii prime de origine petrolieră.

- La ora actuală există metode computaționale eficiente, cu aplicabilitate în domeniul biocatalizei.

- Există o multitudine de materii prime regenerabile care au fost utilizate cu succes în sinteza enzimatică a poliesterilor.

- Metodele de evaluarea a biodegradabilității trebuie atent selecționate.

- Polioli de tipul glicerolului reprezintă o sursă importantă pentru sinteza pe cale enzimatică a unor compuși care prezintă interes în cosmetică și industria farmaceutică.

2. Metodele computaționale de dinamică moleculară și andocare au permis evaluarea stabilității a două lipaze în diverse condiții de temperatură și presiune.

2.1. Studiile de dinamică moleculară au confirmat stabilitatea lipazelor din *Candida antarctica* și *Ps. stutzeri* în condițiile de temperatură și presiune testate.

2.2. Rezultatele obținute în studiile de andocare au confirmat selectivitatea lipazelor pentru substraturile cu grupări OH primare și secundare și au indicat o selectivitate mai mare a lipazei din *Ps. stutzeri* pentru substratul furanic.

3. Au fost sintetizați oligoesteri cu diferite funcțiuni reactive, utilizând ulei de ricin și un derivat furanic în sistem reacții enzimatică „one-pot”, folosind o singură lipază.

3.1. S-a demonstrat posibilitatea utilizării uleiului de ricin ca substrat pentru lipază, în vederea sintezei unor oligoesteri nesaturați cu funcțiuni heteroaromatice.

3.2. Sustenabilitatea procesului a fost îmbunătățită demonstrată prin efectuarea reacțiilor în mediu fără solvent, la temperaturi de până la 80°C.

3.3. În sistemul „one-pot” studiat, formarea terpolimerilor cu unități de acid ricinoleic, derivat furanic și glicerol reprezintă o posibilitate pentru a crește hidrofilicitatea produșilor.

Terpolimerii cu unități de acid ricinoleic, derivat furanic și glicerol obținuți în sistem one-pot reprezintă o oportunitate de creștere a hidrofilicității produșilor.

3.4. Sistemul de reacție propus are eficiență ridicată de biotransformare și poate fi fezabil pentru valorificarea triricinoleinei din uleiurile vegetale.

3.5. Sinteza poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat)-ului în sistem one-pot a fost demonstrată și optimizată utilizând un program experimental factorial utilizând ca materie primă acidul de ricin și lipaza din *Pseudomonas stutzeri* ca biocatalizator. Condițiile optime de reacție au fost temperatura 63°C, raport molar ulei ricin:HFA 3,3:1, cantitate de enzimă 33 U/mmol (substrat total).

3.6. Introducerea unităților heterociclice de furan oferă acces la o gamă largă de noi oligomeri cu proprietăți originale prin procese simple și eficiente. Analiza structurală, formarea copolimerului și compoziția acestuia au fost efectuate folosind tehnici instrumentale moderne, cum ar fi 2D-NMR și MALDI-TOF MS.

3.7. Oligoesterii obținuți în condițiile optime de reacție au fost testați pentru obținerea unor organogeluri în diferiți solvenți organici. Organogelurile obținute în ciclohexan și heptan au prezentat morfologie neîntreruptă cu porozități de aproximativ 50μm.

4. A fost evaluată selectivitatea a două lipaze imobilizate față de 15 dioli în reacții de sinteză a poliesterilor cu unități de acid adipic. Importanța științifică a acestor rezultate este în demonstrarea activității unei lipaze mai puțin studiate în reacții de poliesterificare, cât și în posibilitatea de a direcționa sinteza unor produși cu proprietăți bine definite.

4.1. Selectivitatea lipazei din *Ps. stutzeri* a fost evaluată pentru prima dată sistematic pentru sinteza unor oligoesteri, în diferite condiții de temperatură și medii de reacție.

4.3. Masele moleculare medii ale produșilor au fost determinate prin cromatografie de excluziune sterică, iar structura produșilor de reacție a fost demonstrată prin spectroscopie <sup>1</sup>H-RMN.

4.4. Utilizarea unui solvent organic verde ca mediu de reacție nu a avut un efect semnificativ pentru creșterea gradului de polimerizare al produșilor.

4.5. Dintre enzimele testate CalB s-a dovedit eficiența în această reacție, la temperatura selectată de 85°C.

4.6. Stabilitatea termică a oligoesterilor cu cele mai mari mase moleculare medii a fost studiată prin termogravimetrie. Dintre cei 8 oligoesteri evaluați, cel mai stabil s-a dovedit a fi derivatul cu unități ciclice obținut pe bază de 1,4-ciclohexandimetanol.

5. A fost evaluată biodegradabilitatea a 6 oligoesteri sintetizați și caracterizați și a 3 materii prime în mediu lichid de apă dulce și apă sărată prin monitorizarea oxigenului dizolvat, utilizând sisteme de monitorizare OxyTop.

5.1. Pentru toți compușii testați degradabilitatea (Dt) exprimată în procente, după 21 de zile a fost mai ridicată în mediul lichid inoculat cu apă sărată.

5.2. Dintre cei 3 oligoesteri cu unități furanice valoarea Dt cea mai ridicată s-a obținut pentru derivatul poli(2,5-bis-hidroximetil furan adipat), urmată de poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat).

5.3. Pentru poliesterii alifatici cele mai mari valori Dt >70% s-au obținut pentru poli(1,8-octandiol adipat).

5.4. Monomerii furanici au demonstrat o biodegradabilitate lentă, iar valoarea Dt obținută pentru derivatul cu grupare hidroxil a fost superioară acidului 2,5- furandicarboxilic.

5.5. Rezultatele preliminare obținute în cadrul studiului de evaluare a biodegradabilității sunt promițătoare și încadrează producții obținuți ca potențiali candidați pentru aplicații în domeniul alimentar sau cosmetic.

6. Valorificarea glicerolului pentru obținerea de acid glicerol a fost realizată cu succes pe cale enzimatică, utilizând lacaze imobilizate prin legare covalentă pe suporturi magnetice.

6.1. Au fost testate 4 lacaze comerciale din diferite surse în reacția de oxidare a glicerolului, cea mai eficientă s-a dovedit lacaza din *Trametes versicolor*.

6.2. Au fost testați 5 inițiatori iar cel mai eficient pentru reacția de oxidare a glicerinei s-a dovedit TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil).

6.3. S-a realizat imobilizarea covalentă a lacazelor din *Trametes versicolor* și *Aspergillus sp.* obținându-se 24 de preparate enzimaticice a căror activitate a fost evaluată în reacția de oxidare a 2,6-dimetoxifenolului.

6.4. Cele mai mari ridicate valori ale activității enzimaticice pentru lacazele imobilizate din *Trametes versicolor* - 760  $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$  preparat, s-au obținut când s-a utilizat ca suport o rășină polimetacrilică funcționalizată cu grupări butil-epoxi. Cea mai mare activitate enzimatică utilizând nanoparticule magnetice ca suport s-a obținut pentru lacaza imobilizată din *Trametes versicolor*, 360  $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$  preparat pe suport de tip ferită mixtă NiZn.

6.5. Biocatalizatorul imobilizat și-a menținut activitatea în intervalul de temperatură 30-50°C, fiind observată chiar o creștere a stabilității termice în comparație cu enzima nativă.

6.6. Reducerea legăturii iminice cu  $\text{NaBH}_4$  a avut ca efect creșterea stabilității operaționale cu aproximativ 20%.

6.7. Atât lacaza din *Trametes versicolor* nativă, cât și cea imobilizată au fost utilizate cu succes pentru prima dată ca biocatalizatori în reacția de oxidare a glicerolului.

7. A fost studiată capacitatea lipazei din *Ps. stutzeri* native și imobilizate pentru rezoluția cinetică enantioselectivă 2,2'-furoinului.

7.1. A fost demonstrată pentru prima dată acilarea enantioselectivă a 2,2'-furoinului catalizată de lipaze imobilizate.

7.2. Entraparea lipazelor în matrici de sol-gel s-a dovedit eficientă pentru conversia unor substraturi heteroaromatice de tipul 2,2'-furoinului.

7.3. Dintre cele 9 lipaze testate valorile cele mai ridicate ale conversiei și excesului enantiomeric s-au obținut utilizând lipaza din *Ps. stutzeri* imobilizată prin includere în matrici de sol-gel utilizând amestecul de silani precursori 3GOPrTMOS:TMOS în raport molar 1:1.

7.4. Dintre solvenții testați ca mediu de reacție cel mai eficient s-a dovedit a fi 2-metil tetrahidrofuranul, un solvent verde.

7.5. A fost posibilă reutilizarea biocatalizatorului, acesta menținându-și 21,7% din activitate după 5 cicluri de utilizare.

## CONTRIBUȚIILE ORIGINALE (REZULTATELE ȘTIINȚIFICE NOI)

I. S-au realizat studii computaționale în condiții diferite de temperatură și presiune pentru lipaza din *Ps. stutzeri* care a fost mai puțin studiată anterior.

1. Studiile de dinamică moleculară au demonstrat stabilitatea ridicată a lipazei din *Ps. stutzeri* la temperaturi de 50 și 75°C.

2. Evaluarea situsurilor catalitice ale lipazelor din *Candida antarctica* și *Ps. stutzeri* au indicat flexibilitate și abilitate mai ridicată a lipazei din *Ps. stutzeri* pentru a stabili interacțiuni cu donorii de legături H într-o zonă mai largă a situsului activ.

3. Studiile de andocare efectuate reprezintă rezultatele preliminare pentru evaluarea selectivității și specificității de substrat a lipazei din *Ps. stutzeri*.

II. Elaborarea unui proces enzimatic în sistem „one-pot” pentru a sintetiza oligoesteri ai acidului ricinoleic cu unități furanice, utilizând ulei de ricin și acid 5 hidroximetil-2-furoic ca substraturi.

4. Transformarea în premieră a uleiului de ricin în oligoesteri aromatici în sistem fără solvent.

5. Stabilirea condițiilor optime de reacție printr-un program experimental factorial.

6. Demonstrarea prin spectroscopie 2D RMN a structurii poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat)ului.

7. Utilizarea în premieră a oligoesterilor cu funcțiuni nesaturate și unități furanice pentru obținerea de organogeluri.

III. Sintetiza și caracterizarea de oligoesteri pe cale biocatalitică, utilizând dioli naturali și sintetici și lipaze imobilizate din diferite surse.

8. Stabilirea influenței poziției grupării OH, gradului de nesaturare a substratului, a sursei enzimei, a temperaturii și a mediului de reacție asupra formării produșilor de oligomerizare.

9. Demonstrarea superiorității lipazei din *Candida antarctica* pentru sinteza oligoesterilor alifatici, respectiv a lipazei din *Ps. stutzeri* pentru oligoesterii aromatici sau ciclici.

IV. Evaluarea impactului ecologic al oligoesterilor sintetizați pe cale enzimatică în medii lichide cu apă dulce și apă sărată

10. Evaluarea biodegradabilității în medii lichide a 6 oligoesteri cu unități furanice și alifatici.

11. Utilizarea proprietăților termice ale oligoesterilor pentru o posibilă corelare cu proprietățile de biodegradabilitate.

V. Valorificarea enzimatică a glicerolului utilizând enzime oxidative, native și imobilizate.

12. S-a determinat influența sursei lacazei, a inițiatorilor și a suportului de imobilizare pentru sinteza preferențială a acidului glicerol utilizând glicerol ca substrat.

13. A fost pentru prima dată demonstrată eficiența lacazei din *Trametes versicolor* imobilizată prin legare covalentă pe suporturi magnetice pentru această reacție.

VI. Evaluarea comparativă a capacității lipazelor CalB și din *Ps. stutzeri* imobilizată pentru acilarea enantioselectivă a 2,2'-furoinului.

14. Au fost evaluate 9 preparate enzimatiche comerciale sau obținute în cadrul grupului de biocataliză în vederea stabilirii eficienței catalitice în reacția de acilare enantioselectivă a 2,2'-furoinului și s-a demonstrat pentru prima dată superioritatea lipazei din *Ps stutzeri* imobilizată prin entrapare în matrici de sol-gel pentru această reacție.

## 5. Bibliografie

[1] A. Todea, D. M. Dreava, I. C. Benea, I. Bîțcan, F. Peter, and C. G. Boeriu, "Achievements and trends in biocatalytic synthesis of specialty polymers from biomass-derived monomers using lipases," *Processes*, vol. 9, no. 4, 2021, doi: 10.3390/pr9040646.

[2] A. Pellis, J. W. Comerford, A. J. Maneffa, M. H. Sipponen, J. H. Clark, and T. J. Farmer, "Elucidating enzymatic polymerisations: Chain-length selectivity of *Candida antarctica* lipase B towards various aliphatic diols and dicarboxylic acid diesters," *Eur. Polym. J.*, vol. 106, no. July, pp. 79–84, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.07.009.

[3] I. Bîțcan et al., "One-pot green synthesis and characterization of novel furan-based oligoesters," *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 35, p. 101229, 2023, doi: 10.1016/j.scp.2023.101229.

[4] P. Das and P. Tiwari, "Thermal degradation kinetics of plastics and model selection," *Thermochim. Acta*, vol. 654, no. March, pp. 191–202, 2017, doi: 10.1016/j.tca.2017.06.001.

[5] I. Bîțcan et al., "Enzymatic route for selective glycerol oxidation using covalently immobilized laccases," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 163, no. December 2022, 2023, doi: 10.1016/j.enzmictec.2022.110168.

[6] R. A. Gross, M. Ganesh, and W. Lu, "Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations," vol. 28, pp. 435–443, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.05.004.