



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Biotransformação bacteriana de ácido ferúlico obtido de resíduo lignocelulósico
a 4-vinilguaiacol

São José do Rio Preto-SP

2018

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Biotransformação bacteriana de ácido ferúlico obtido de resíduo lignocelulósico
a 4-vinilguaiacol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Ibilce, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp, Campus de São José do Rio Preto como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Guillermo Ladino Orjuela

São José do Rio Preto-SP

2018

Santos , Maitê Bernardo Correia dos.

Biotransformação bacteriana de ácido ferúlico obtido de resíduo lignocelulósico a 4-vinilguaicol / Maitê Bernardo Correia dos Santos . -- São José do Rio Preto, 2018

55 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Coorientador: Guillermo Ladino Orjuela

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Bagaço de cana. 3. Cana de açúcar. 4. Hidrólise. 5. Biotransformação. 6. Lignina. 7. Lignocelulose. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 664.11

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Maitê Bernardo Correia dos Santos

Biotransformação bacteriana de ácido ferúlico obtido de resíduo lignocelulósico
a 4-vinilguaiacol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Ibilce, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp, Campus de São José do Rio Preto como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Dr. Ricardo Barros Mariutti

UNESP – São José do Rio Preto-SP

Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

USP – São Carlos

São José do Rio Preto-SP

6 de abril de 2018

Dedico àqueles que apoiaram meus sonhos ao longo desse caminho, alicerçando a construção
desta conquista.

Com amor e gratidão, Sra. Isabel e Sr. Edgar.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, Unesp e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

À Capes pela bolsa concedida.

À Fapesp pelos recursos financeiros que custearam esse trabalho.

A Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes, pela dedicação nas correções e orientações neste período de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Guillermo Ladino Orjuela e ao Me. Diego Alves Monteiro, pela paciência e pelas lições de microbiologia, que participaram de modo definitivo em meu aprendizado.

À minha amada família, em especial aos meus pais Sra. Isabel e Sr. Edgar, minhas irmãs Pamella e Isabella e ao querido Juvenal, que não se ausentaram nem mesmo nos momentos mais difíceis, sempre me apoiando, mesmo com a distância criada pela dedicação a esta etapa da vida.

À minha querida amiga Corina, que sempre deu seu exemplo de garra e perseverança e ainda me concedia bons momentos de café.

Aos meus colegas de pós-graduação que tornaram um período de longa dedicação em algo divertido.

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”
Antoine Laurent Lavoisier.

RESUMO

O Brasil, por sua condição de grande produtor agrícola, também é grande produtor de resíduos lignocelulósicos. Esses resíduos, muitas vezes considerados sub-produtos ou co-produtos, são fontes de açúcares, derivados da celulose e hemicelulose, e de compostos aromáticos, oriundos da lignina, que servem de substratos para diversos processos químicos e biológicos para obtenção de produtos de alto valor agregado. Um dos compostos liberados em abundância durante a desconstrução do material lignocelulósico é o ácido ferúlico cuja biotransformação pode resultar em derivados químicos com aplicações nas indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos. Neste trabalho estudou-se a bioconversão bacteriana do ácido ferúlico comercial e daquele obtido a partir da hidrólise alcalina da lignina, em 4-vinilguaiacol. A biotransformação de ácido ferúlico comercial em 4-vinilguaiacol foi estudada em meio líquido sintético contendo o ácido ferúlico em concentração inicial de 300 mg L^{-1} , por 48 horas. Após 24 horas de cultivo, obteve-se um rendimento de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 4-vinilguaiacol que correspondeu a uma conversão de 32,4% do ácido ferúlico. Na continuidade do trabalho, a cepa foi utilizada para bioconverter o ácido ferúlico oriundo da hidrólise da lignina contido no licor obtido por hidrólise alcalina do bagaço de cana-de-açúcar, cuja concentração de ácido ferúlico era de $310,14 \text{ mg L}^{-1}$. Após 32 horas de cultivo obteve-se um rendimento de $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de 4-vinilguaiacol que correspondeu a uma conversão de 81,7% do ácido ferúlico presente no licor. Esses resultados obtidos demonstraram que a bactéria estudada atuou na descarboxilação do ácido ferúlico a 4-vinilguaiacol.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise alcalina, ácido ferúlico, 4-vinilguaiacol, biotransformação.

ABSTRACT

Brazil, is an important agricultural producer and also a big producer of lignocellulosic wastes. These material can generate sugars from cellulose and hemicellulose saccharification and aromatic compounds, derived from lignin, which serve as substrates for various chemical and biological processes to obtain the high added values products. One of the compounds released during the deconstruction of lignocellulosic material is ferulic acid whose biotransformation can lead to the generation of important products. This work aims at the bacterial bioconversion of commercial ferulic acid and those obtained from the alkaline hydrolysis of lignin to 4-vinylguaiacol. The biotransformation of commercial ferulic acid in 4-vinylguaiacol was studied in synthetic liquid medium containing the ferulic acid in an initial concentration of 300 mg L⁻¹, for 48 hours. After 24 hours of cultivation a yield of 0.5 mmol L⁻¹ of 4-vinylguaiacol was obtained which corresponded to a conversion of 32.4% of the ferulic acid. In the continuity of the work, the strain was used to bioconvert the ferulic acid from the hydrolysis of the lignin contained in the lycor obtained by alkaline hydrolysis of the sugarcane bagasse that presented the ferulic acid concentration of 310.14 mg L⁻¹. After 32 hours of cultivation, a yield of 4-vinylguaiacol was 1.3 mmol L⁻¹ corresponding to a conversion of 81.7% of the ferulic acid. The results showed that the strain decarboxylated the ferulic acid to 4-vinylguaiacol.

Keywords: lignocellulosic residues; alkaline hydrolysis; ferulic acid; 4-vinylguaiacol; biotransformation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Resíduos lignocelulósicos: composição e potencial de aproveitamento	16
2.2	Ácido ferúlico	18
2.3	Biotransformação de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol	21
3	MATERIAL E MÉTODO.....	26
3.1	Microrganismo	26
3.2	Meios de cultivo.....	26
3.3	Padronização do inóculo para cultivo das cepas.....	27
3.4	Definição das condições adequadas para cultivo da cepa	27
3.5	Ensaio para avaliação da tolerância da bactéria ao ácido ferúlico	28
3.6	Fermentação submersa para avaliação da bioconversão do ácido ferúlico em meio sintético.....	29
3.7	Obtenção de ácido ferúlico a partir de bagaço de cana-de-açúcar	29
3.7.1	Preparo da matéria-prima	29
3.7.2	Hidrólise alcalina do bagaço	30
3.7.3	Quantificação do ácido ferúlico presente no lícor	31
3.8	Fermentação submersa para avaliação da bioconversão do ácido ferúlico presente no lícor.....	32
3.9	Avaliação qualitativa da presença de enzima ácido ferúlico descarboxilase	32
3.10	Métodos analíticos.....	34
3.10.1	Padrões analíticos.....	34
3.10.2	Análise dos com postos por hplc	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Avaliação dos efeitos da temperatura e pH sobre o crescimento da bactéria TD 4.7	38
4.2	Avaliação da tolerância da bactéria ao ácido ferúlico	39
4.3	Fermentação submersa para avaliação da bioconversão do ácido ferúlico presente em meio sintético	41
4.4	Obtenção de ácido ferúlico a partir de bagaço de cana-de-açúcar	46
4.5	Fermentação submersa para avaliação da bioconversão do ácido ferúlico em lícor.....	46
4.6	Avaliação qualitativa da presença de enzima ácido ferúlico descarboxilase	48
5	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Fluxograma de produção de etanol e sacarose	16
FIGURA 2 - Representação esquemática da molécula de celulose.	17
FIGURA 3 - Representação esquemática da molécula de hemicelulose.	18
FIGURA 4 - Fórmula estrutural do ácido ferúlico.....	19
FIGURA 5 - Síntese de ácido ferúlico e outros compostos aromáticos através da via do ácido shikímico (pal: fenilalanina amônia-liase; tal: tirosina amônia-liase; sam: s-adenosilmetionina).	19
FIGURA 6 - Estrutura cristalográfica da proteína ácido ferúlico descarboxilase (PDB: 4S13). 22	22
FIGURA 7 - Representação esquemática da via metabólica de metabolização do ácido ferúlico por bactérias	23
FIGURA 8 - Colônias da cepa bacteriana TD 4.7	26
TABELA 1 - Temperaturas e pH testados no crescimento da cepa	28
FIGURA 9 - BAGAÇO DE CANA IN NATURA (I) E PROCESSADO (II).....	30
FIGURA 10 - Bagaço de cana-de-açúcar submetido a tratamento alcalino após secagem (I) e lícór resultante (II)	31
TABELA 2 - Metabólitos descritos como envolvidos na via metabólica do ácido ferúlico por bactérias	34
TABELA 3 - Tempo de retenção dos compostos analisados em hplc	35
FIGURA 11 - Curvas de crescimento da cepa bacteriana TD 4.7 em diferentes pH, sob a temperatura de 25°C	38
FIGURA 12 - Curvas de crescimento da cepa bacteriana TD 4.7 em diferentes pH, sob a temperatura de 28°C	39
FIGURA 13 - Curvas de crescimento da cepa bacteriana TD 4.7 em diferentes pH, sob temperatura de 30°C	39
FIGURA 14 - Efeitos de diferentes concentrações de ácido ferúlico, sobre o crescimento da cepa bacteriana em meio líquido nutritivo a 28°C, PH 6,5.....	40
FIGURA 15 - Perfil de crescimento da bactéria, variações nas concentrações de glicose, ácido ferúlico, 4-vinilguaiacol, e de pH.....	42
FIGURA 16 - Espectro de massas referentes ao 4-vinilguaiacol	43
FIGURA 17 - Cromatograma, obtido de amostras do meio após 24 horas de cultivo, picos: 7,45 min. - catecol; 13,99 min. - ác. vanílico; 16,42 min. – vanilina; 22,76 min. – ác. ferúlico e 28,81 min. – 4-vinilguaiacol	43
FIGURA 18 - Concentração dos metabólitos no meio em função do tempo	44
TABELA 4 - Rendimento da conversão de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol após 32 horas de incubação.	45
FIGURA 19 - Proposta de via metabólica utilizada pela cepa bacteriana para conversão do ácido ferúlico	45

TABELA 5 - Composição de açúcares e ácido ferúlico do lícor obtido por tratamento alcalino do bagaço de cana.....	46
FIGURA 20 - Perfil de crescimento da bactéria, variações nas concentrações de glicose, ácido ferúlico e de 4-vinilguaiacol, variações de pH	47
TABELA 6 - Rendimento da conversão de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol após 32 horas de incubação.	47
FIGURA 21 - Perfil de formação de 4-vinilguaiacol em reação enzimática em extrato extracelular, intracelular e de parede celular	49

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica representa uma vasta fonte de substratos para a obtenção de diversos produtos químicos, como biocombustíveis e produtos aplicáveis as indústrias alimentícia e de química fina.

Há décadas, pesquisas vem buscando o desenvolvimento de processos que permitam a obtenção dos açúcares a partir dos polissacarídeos celulose e hemicelulose visando as mais diversas aplicações (CHUNDAWAT et al., 2011). Entretanto, a lignina, por ser um heteropolímero aromático, geralmente é subutilizada em processos químicos devido à complexidade dos compostos liberados pelos processos oxidativos aplicados na fragmentação desse complexo polímero. Embora tenha reconhecida importância como fonte de químicos com grande potencial de aplicação, a separação e identificação desses compostos são muito difíceis e demandam custo e tecnologia. Por outro lado, o aproveitamento da lignina e de seus derivados é uma questão premente dado o intenso uso de resíduos de lignocelulósicos principalmente aqueles oriundos da cana-de-açúcar (HIMMEL et al., 2007).

Na safra de 2016/2017 foram produzidas no Brasil, cerca de 370 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, disponibilizando 20 milhões de toneladas de bagaço de cana, um material composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (BRASÍLIA, 2017).

Em função de sua organização estrutural e recalcitrância química e biológica, para ser utilizada, a biomassa lignocelulósica precisa ser submetida a tratamentos químicos ou físicos, que resultam, na maioria dos casos, na remoção da lignina e separação dos polímeros de açúcar. O licor, que corresponde a fração de lignina, é rico em compostos aromáticos, os quais podem ser utilizados como matéria-prima para uma grande variedade de reações de síntese e transformações químicas e/ou biológicas (ROOPAN, 2017).

Os métodos biológicos para a conversão destes compostos em produtos de valor agregado são alternativas importantes uma vez que permitem a bioconversão destes materiais com baixo custo e com direcionamentos específicos levando à formação de produtos com níveis de pureza que permitam um processo viável do ponto de vista econômico (LINGER et al., 2014).

O ácido ferúlico é um dos compostos fenólicos mais abundantes na biomassa lignocelulósica, ocorrendo em paredes celulares de plantas, livre ou ligados covalentemente aos biopolímeros de hemicelulose e lignina. A biotransformação desse composto segue vias diferentes conforme o microrganismo, porém, na via metabólica mais comum, o 4-

vinilguaiacol é o primeiro produto a ser gerado por mecanismo de descarboxilação. Este composto é aplicável na indústria alimentícia como aromatizante em cervejas, como material de partida para o fabrico de produtos químicos como a vanilina e na indústria farmacêutica como preparados para usos oftálmicos (JOSEPH; ERNING, 2006; MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007).

A maioria dos trabalhos direcionados à biotransformação de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol foi realizada a partir de meios sintéticos e semi-sintéticos. Nesse trabalho, além de explorar o uso de bactéria isolada do ambiente para essa biotransformação, visa a utilização do ácido ferúlico obtido de hidrolisados alcalinos de bagaço de cana-de-açúcar.

1.1 OBJETIVOS

GERAL

- Avaliar a bioconversão do ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol por uma linhagem bacteriana

ESPECÍFICOS

- Definir os níveis de tolerância da bactéria ao ácido ferúlico;
- Avaliar a bioconversão bacteriana do ácido ferúlico comercial a 4-vinilguaiacol em meio sintético;
- Avaliar a bioconversão bacteriana do ácido ferúlico proveniente da quebra da lignina e presente em hidrolisado alcalino de bagaço de cana a 4-vinilguaiacol.

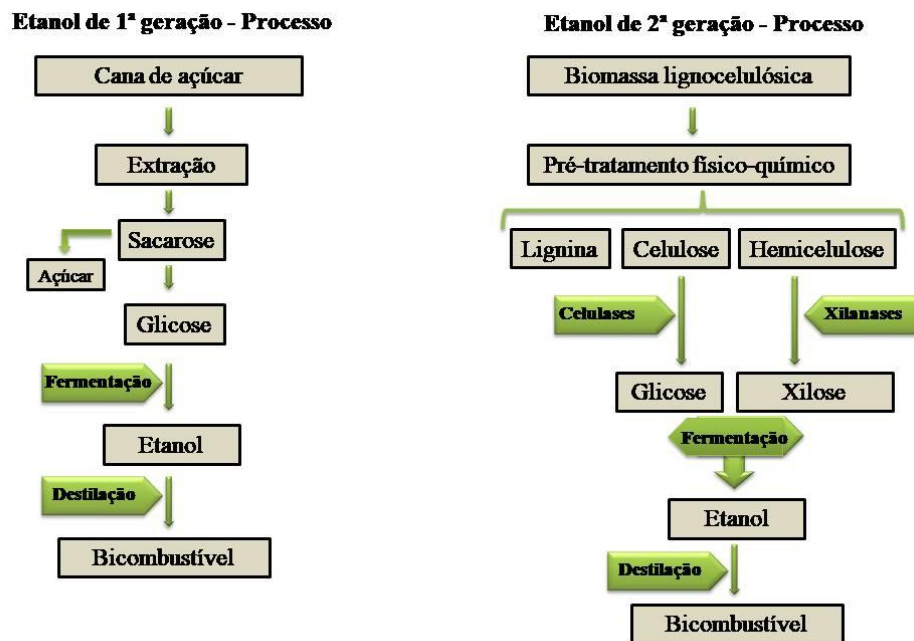
2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS: COMPOSIÇÃO E POTENCIAL DE APROVEITAMENTO

O Brasil, por ter sua economia alicerçada na produção agrícola e agro-industrial, é, conseqüentemente, um grande gerador de materiais lignocelulósicos, que podem ser considerados resíduos, sub-produtos ou co-produtos. A produção de cana-de-açúcar visando à geração de sacarose a ser diretamente comercializada ou a de glicose invertida para fermentação e a produção de etanol, gera toneladas de materiais lignocelulósicos como a palha e o bagaço. Na última década foram desenvolvidos processos e propostas de conversão de lignocelulose do bagaço e da palha em açúcar para a obtenção de etanol de "segunda geração" ou de bioetanol celulósico (Figura 1).

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE ETANOL E SACAROSE



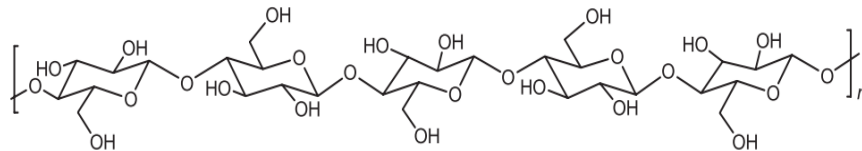
Fonte: autor.

Do total de cana-de-açúcar processado na indústria, cerca de 370 milhões de toneladas/ano, 30% corresponde ao bagaço, ou seja em torno de 111 milhões de toneladas

(BRASÍLIA, 2017). Na indústria, esse material tem sido queimado nas caldeiras para geração de energia calorífica e elétrica, embora seja uma importante fonte de açúcares para a produção de uma gama de compostos se utilizada em bioprocessos de fermentação ou conversão. Além dos açúcares, a lignina é liberada na forma de variados compostos aromáticos com grande potencial de uso em diferentes bioprocessos (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

A celulose, a hemicelulose e a rede de lignina interagem entre si para compor as estruturas das paredes celulares primárias e secundárias das plantas (PÉREZ et al., 2002). A celulose é o principal constituinte das paredes das células vegetais e representa em torno de 35 a 50% da massa seca total das células. Sua função é estrutural, conferindo proteção osmótica e resistência mecânica à célula. É composta por uma cadeia linear de unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, com um grau de polimerização variando de várias centenas a mais de dez mil. As ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular formam feixes de moléculas de celulose que se agregam na forma de microfibrilas, formando regiões altamente organizadas (cristalinas) e as regiões menos organizadas (amorfas) (Figura 2) (ARANTES; SADDLER, 2010; SUN et al., 2016).

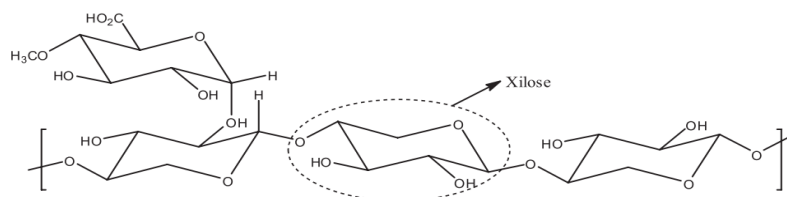
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE CELULOSE.



Fonte: (SANTOS et al., 2012)

A hemicelulose, presente principalmente nas paredes primária e secundária celular das plantas, associada à lignina e celulose, corresponde a polissacarídeos compostos por vários tipos açúcares como pentoses (D-arabinose e D-xilose) e hexoses (D-galactose, D-manose e D-glicose), unidos em sua grande maioria por ligações do tipo β -1,4, além de ácidos urônicos (WYMAN et al., 2005). A hemicelulose representa em torno de 15% a 30% da massa seca dos materiais lignocelulósicos e é classificada de acordo com os principais açúcares presentes, como glicanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (Figura 3) (GÍRIO et al., 2010; XIAO-FENG SUN et al., 2005).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE HEMICELULOSE.



Fonte: (SANTOS et al., 2012)

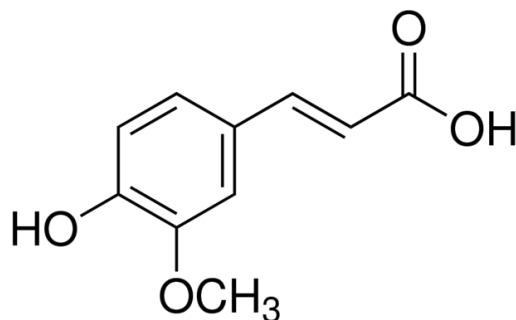
A lignina é um heteropolímero essencial para a estruturação da parede celular de plantas vasculares e é o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose. A constituição aromática e as ligações éter conferem a esse composto elevada estabilidade frente a agentes químicos e biológicos, o que torna uma molécula considerada altamente recalcitrante. Nas plantas, desempenha papel importante na resistência aos ataques de patógenos, confere resistência ao tecido lenhoso e impermeabiliza os vasos condutores (CAMPBELL; SEDEROFF, 1996; VANHOLME et al., 2010). É composta basicamente de unidades de fenilpropano derivadas do álcool cinâmico substituído, que são cumarílico, coniferílico e álcool siringílico. E representa 15-30% da massa seca da matéria lignocelulósica. São altamente ramificadas, covalentemente ligada à celulose e à hemicelulose e tem estrutura e composição química variando de acordo com a fonte de origem (RALPH et al., 2004; VANHOLME et al., 2010). As gramíneas, como a cana-de-açúcar, apresentam altos teores de ácido ferúlico, de forma livre ou ligada covalentemente a lignina e outros polímeros da planta como a hemicelulose presente nos componentes da parede celular (DAMASCENO et al., 2010; HATFIELD et al., 1994; XU et al., 2005).

2.2 ÁCIDO FERÚLICO

O ácido ferúlico (Figura 4), nome IUPAC (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enoico e fórmula molecular C₁₀H₁₀O₄, pertence a família dos ácidos hidroxicinâmicos. Isolado pela primeira vez da planta *Ferula foetida*, o ácido ferúlico apresenta uma cadeia lateral não saturada e aparece nas formas isoméricas *cis* e *trans*, devido à ligação dupla presente na cadeia lateral que é submetida à isomerização *cis-trans* e o grupamento fenoxi estabilizado

por ressonância é responsável por sua efetiva atividade antioxidante (HLASIWETZ; BARTH, 1866).

FIGURA 4 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO FERÚLICO.

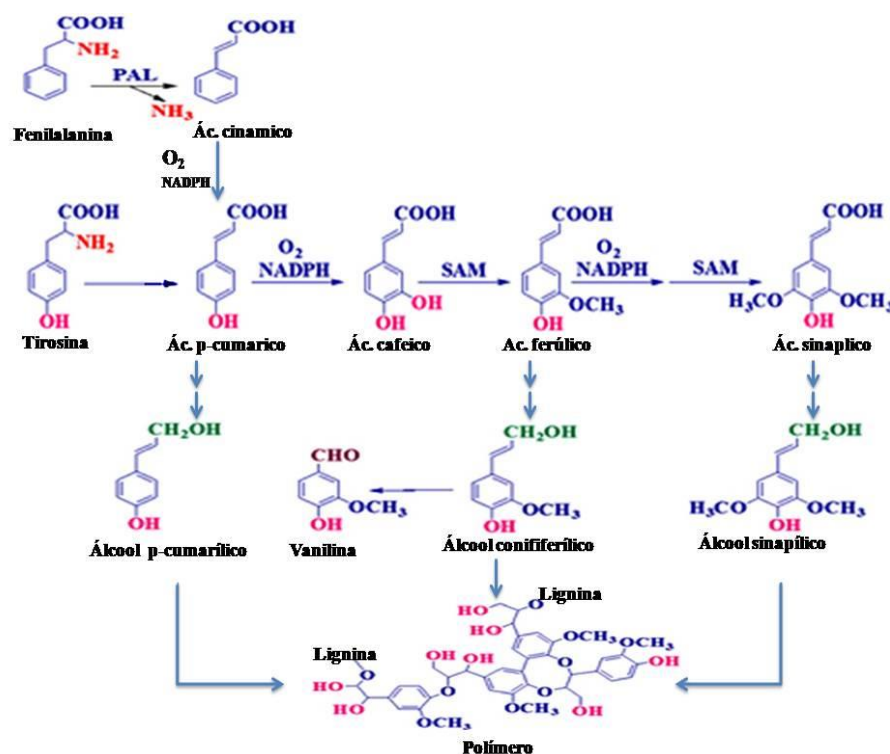


Fonte: sigmaaldrich.com

O ácido ferúlico é um dos ácidos fenólicos mais abundantes na matéria lignocelulósica, existindo de forma livre ou ligada covalentemente à lignina e a outros polímeros da planta como a hemicelulose presente nos componentes da parede celular. Confere rigidez à parede celular fazendo a reticulação entre polissacarídeos e lignina. (FIORENTINO et al., 2003; MATHEW; ABRAHAM, 2006).

A síntese de ácido ferúlico nas plantas ocorre pela via metabólica do ácido shikímico, iniciando com aminoácidos aromáticos, L-fenilalanina e L-tirosina como precursores. Inicialmente, a fenilalanina e a tirosina são convertidas em ácido cinâmico e *p*-cumárico pelas enzimas fenilalanina amônia-liase e tirosina amônia-liase, respectivamente (GRAF, 1992). O ácido *p*-cumárico converte-se em ácido ferúlico por hidroxilação e reação de metilação. A oxidação e a metilação de ácido ferúlico e outros compostos aromáticos geram derivados de di e tri-hidroxi do ácido cinâmico, que participam da formação de lignina juntamente com ácido ferúlico (GOWRI et al., 1991). As reações de conversão ocorrem durante a formação de ácido ferúlico e outros compostos aromáticos, como representado na Figura 5.

FIGURA 5 - SÍNTESE DE ÁCIDO FERÚLICO E OUTROS COMPOSTOS AROMÁTICOS ATRAVÉS DA VIA DO ÁCIDO SHIKÍMICO (PAL: FENILALANINA AMÔNIA-LIASE; TAL: TIROSINA AMÔNIA-LIASE; SAM: S-ADENOSILMETIONINA).



Fonte: adaptado de (KUMAR; PRUTHI, 2014)

A extração de ácido ferúlico a partir de fontes naturais é um processo viável do ponto de vista ambiental e econômico em função de sua aplicabilidade em bioprocessos podendo ser usado para síntese ou composição de muitas drogas, alimentos funcionais e nutracêuticos. Embora encontre-se amplamente presente na parede celular dos materiais lignocelulósicos, o ácido ferúlico não é diretamente disponível para a bioconversão, pois está ligado covalentemente com uma variedade de carboidratos (TILAY et al., 2008). Métodos alcalinos, ácidos e enzimáticos para a extração de ácido ferúlico de diferentes fontes de biomassa têm sido propostos na literatura (BURANOV; MAZZA, 2009; MATHEW; ABRAHAM, 2005, 2006; XU et al., 2005).

O tratamento alcalino é o método que leva à maior solubilização da lignina, pois em as ligações éster da hemicelulose com a lignina são mais facilmente quebradas em condições alcalinas, promovendo significativa solubilização de lignina e pouca degradação da hemicelulose e celulose. Vários reagentes podem ser utilizados para este processo, como o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônia, hidróxido de cálcio. O hidróxido de sódio é o reagente mais usado para este pré-tratamento (REN et al., 2016).

Durante a remoção e/ou fracionamento da lignina em tratamentos alcalinos, diversas substâncias fenólicas podem ser formadas, as quais dependem da fonte da planta e da

intensidade do processo (LARSSON et al., 1999). Em geral, a mistura resultante é composta de aldeídos, cetonas fenólicas, ácidos fenólicos e álcoois fenólicos, tais como, o ácido 5-(Hidroximetil)furfural, o ácido 2-furóico, o 4-hidroxibenzaldeído, o ácido 4-hidroxibenzóico, a vanilina, o álcool coniferílico, o siringaldeído, o ácido siringico e o ácido ferúlico (GILARDI et al., 1990, SUN et al., 2016).

2.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DE ÁCIDO FERÚLICO EM 4-VINILGUAIAICOL

O ácido ferúlico, presente em grandes proporções em hidrolisados de materiais lignocelulósicos, constitui uma importante matéria-prima renovável para conversão biocatalítica em produtos químicos de alto valor agregado. Um dos principais compostos resultantes da descarboxilação do ácido ferúlico é o 4-vinilguaiaicol (3-metoxi-4-hidroxiestireno), cujo custo comercial é consideravelmente maior comparado ao ácido ferúlico. O 4-vinilguaiaicol, com um aroma picante de cravo é um componente valioso na indústria de alimentos, particularmente como aromatizante em cervejas, vinhos e molho de soja e na indústria cosmética na produção de fragâncias (MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 2010).

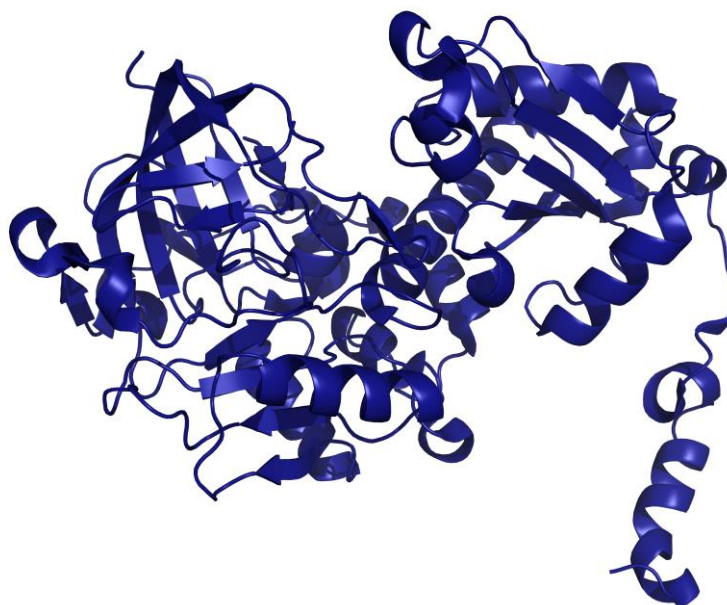
A demanda industrial de 4-vinilguaiaicol não é atendida por extração a partir de fontes naturais, bem como a sua síntese por vias químicas requer reagentes de alto custo, condições severas de processamento e o rendimento entre 30% e 40% (BERNINI et al., 2007). Por outro lado, a síntese por descarboxilação biológica de ácidos cinâmicos, como o ácido ferúlico, pode ser realizada por microrganismos ou suas enzimas. Diferentes microrganismos, principalmente bactérias, são capazes de transformar ácido ferúlico em 4-vinilguaiaicol (ROSAZZA et al., 1995).

A via de bioconversão microbiológica do ácido ferúlico a 4-vinilguaiaicol é a reação de descarboxilação não oxidativa por ação da enzima ácido ferúlico descarboxilase (EC 4.1.1.102) (DEGRASSI et al., 1995; DONAGHY et al., 1999a; HUANG et al., 2012; MO et al., 2010; PRIEFERT et al., 2001).

Isolada e caracterizada pela primeira vez a partir de *Pseudomonas fluorescens* UI 670, a enzima ácido ferúlico descarboxilase não requer cofatores e não contém grupos prostéticos. Esta enzima também descarboxila o ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol, por meio de uma descarboxilação não oxidante (DEGRASSI; POLVERINO DE LAURETO; BRUSCHI, 1995; ROSAZZA et al., 1995).

A partir de *Saccharomyces cerevisiae*, em 2015 teve sua estrutura (Figura 6), resolvida por meio de cristalografia de raios-X (PDB: 4S13), evidenciando os detalhes de sua interação com 4-vinilguaiacol em nível atômico (BHUIYA et al., 2015).

FIGURA 6 - ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA PROTEÍNA ÁCIDO FERÚLICO DESCARBOXILASE (PDB: 4S13).

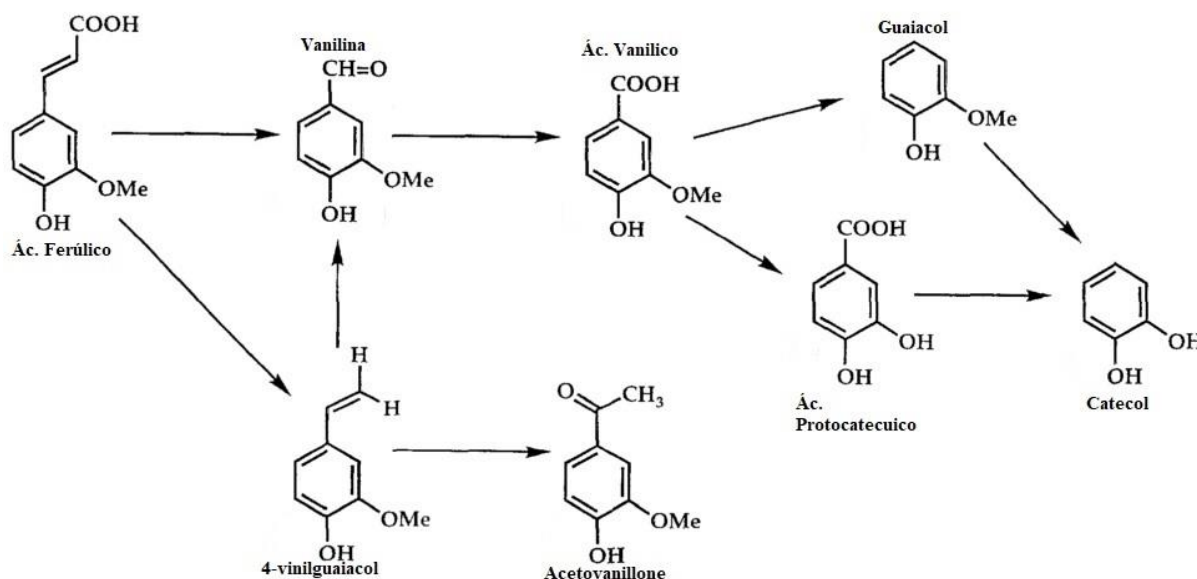


Fonte: adaptado de (BHUIYA et al., 2015)

Os métodos enzimáticos são mais adequados para a produção de compostos aplicáveis às indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética pois requerem condições de reação brandas, apresentam alta seletividade com relação ao substrato e não gera subprodutos, resultando em produto final química e enantiomericamente mais puros (ROSAZZA, 1994).

Estudos mostraram que os microrganismos podem seguir diferentes rotas metabólicas para o ácido ferúlico (Figura 7) sendo gerados vários produtos com potencial de aplicação (ROSAZZA et al., 1995). Para algumas cepas bacterianas, como por exemplo *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus*, o 4-vinilguaiacol foi o produto final da reação (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1993; LEE; VOLM; ROSAZZA, 1998) ou um intermediário do metabolismo para as cepas de *Bacillus coagulans* e *Enterobacter sp.* (KARMAKAR et al., 2000; LI et al., 2008; SALGADO et al., 2012).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA METABÓLICA DE METABOLIZAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO POR BACTÉRIAS



Fonte: adaptado de (ROSAZZA et al., 1995)

Karmakar e colaboradores (2000), propuseram que na rota metabólica utilizada pela cepa de *Bacillus coagulans* o ácido ferúlico foi descarboxilado a 4-vinilguaiacol, e convertido em vanilina e, posteriormente oxidada a ácido vanílico, seguido da desmetilação a ácido protocatecuico e formação de catecol. O 4-vinilguaiacol foi o principal produto.

Li e colaboradores (2008), relataram em trabalho com uma cepa de *Enterobacter* sp. Px6-4, a capacidade do microrganismo formar primeiramente 4-vinilguaiacol dentre os metabólitos envolvidos na transformação de ácido ferúlico em vanilina. Hunter e colaboradores (2012), obtiveram a formação de 4-vinilguaiacol como principal produto com pequenas quantidades de vanilina, álcool vanílico e ácido vanílico por *Enterobacter soli* e *Enterobacter aerogenes* quando cultivados em meio com o ácido ferúlico.

Embora em numerosos trabalhos diferentes microrganismos tenham sido relatados como capazes de bioconverter o ácido ferúlico a 4-vinilguaiacol, todos baseiam-se em cultivo em meio sintético, exceto Salgado e colaboradores (2012) que demonstraram a bioconversão de ácido ferúlico obtido a partir de resíduos lignocelulósicos. Esse estudo realizado com *Streptomyces setonii*, em fermentação em estado sólido mostrou a obtenção de 4-vinilguaiacol.

Pelo exposto, ficou evidenciado que diversos microrganismos tem potencial para bioconversão do ácido ferúlico, porém, ainda não se tem um processo estabelecido, assim como, a fonte de ácido ferúlico ainda é comercial embora resíduos lignocelulósicos sejam potenciais fontes desse composto. Desse modo, o presente trabalho busca conhecer novos microrganismos com esse potencial de bioconversão e explorar hidrolisados de bagaço de cana como fonte de ácido ferúlico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MICRORGANISMO

Foi utilizada uma cepa bacteriana denominada TD 4.7 (Figura 8), da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

FIGURA 8 - COLÔNIAS DA CEPA BACTERIANA TD 4.7



Fonte: autor.

3.2 MEIOS DE CULTIVO

Foram utilizados nesse trabalho, o meio líquido nutritivo (BERTANI, 1951) composto por glicose a 0,2%, cloreto de sódio a 0,1%, triptona a 1% e extrato de levedura a 0,5% e solução mineral (BUSHNELL; HAAS, 1941) composta por nitrato de amônio de 0,1%, sulfato de magnésio a 0,02%, cloreto de cálcio a 0,002%, fosfato de potássio a 0,1%, fosfato de monopotássio a 0,1% e sulfato de amônia hidratado a 0,005%.

3.3 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO PARA CULTIVO DAS CEPAS

Foi feito cultivo por 12 horas, em 25 mL de meio líquido nutritivo, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a 30 °C e agitação de 150 rpm. A cada duas horas foram colhidas alíquotas e as absorbâncias determinadas a 600_{nm} para avaliação do crescimento bacteriano. Paralelamente, amostras das mesmas suspensões foram centrifugadas a 10000 ×g, por 15 min., sendo o sobrenadante descartado e as células resuspendidas em água destilada e centrifugadas novamente. O precipitado de células foi, então, levado à estufa a 60 °C, em microtubos plásticos de massa conhecido, sendo a biomassa medida até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, plotando-se em gráfico, os valores de absorbância (600_{nm}) representando a densidade celular e de massa seca correspondentes, obtendo-se uma equação de regressão linear. Esta equação foi utilizada para estimar a massa celular a ser utilizada como inóculo.

A determinação do número de células viáveis foi feita por plaqueamento com diluição seriada. O cálculo para obtenção do número de células por mL foi realizado pela equação:

$$\text{Células mL}^{-1} = \text{n}^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{diluição da placa contada}$$

3.4 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ADEQUADAS PARA CULTIVO DA CEPA

3.4.1 OBTENÇÃO DO INÓCULO

O pré-inóculo foi preparado por suspensão de células bacterianas obtidas na coleção bacteriana indicada no sub item 3.1, adicionadas ao cultivo nutritivo acima descrito, o qual foi incubado a 30 °C, a 150 rpm, com densidade ótica analisada em espectrofotômetro (DO 600_{nm}=0,8) conforme padronizado.

3.4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DO PH NO CRESCIMENTO DA BACTÉRIA

Nos testes, as faixas de temperatura \times pH, os fatores foram definidos como segue na Tabela 1:

TABELA 1 - TEMPERATURAS E pH TESTADOS NO CRESCIMENTO DA CEPA

Fator	Nível		
	Superior	Central	Inferior
pH	6,5	6,0	5,5
Temperatura	30 °C	28 °C	25 °C

Frascos erlenmeyers de 50 mL contendo 20 mL de meio líquido nutritivo, nos valores de pH definidos na Tabela 1, foram inoculados com 0,2 mL de cultura bacteriana, e incubados a 25°C, 28°C e 30°C. Um erlenmeyer com meio líquido nutritivo, sem inóculo, foi utilizado como controle abiótico. A cada duas horas, em câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas e determinado o crescimento bacteriano através da absorbância em 600_{nm} em espectrofotômetro Molecular Devices SpectraMax.

3.5 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA BACTÉRIA AO ÁCIDO FERÚLICO

O pré-inóculo foi encubado em frasco erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de meio líquido nutritivo, a 28 °C e agitação de 150 rpm. O acompanhamento do crescimento foi feito pelo aumento na absorbância (DO 600_{nm}).

Quando a cultura atingiu a DO 600_{nm} = 0,8, uma alíquota de 0,2 mL foi utilizada para inocular frascos erlenmeyers de 50 mL contendo 20 mL de meio líquido nutritivo com as concentrações de 100 mg L⁻¹, 200 mg L⁻¹, 300 mg L⁻¹, 400 mg L⁻¹ e 500 mg L⁻¹ de ácido ferúlico, em triplicatas. A cultura foi incubada a 28 °C, agitação de 150 rpm durante 12 horas. A cada 2 horas, em câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas e determinado o crescimento, por absorbância em 600_{nm}. Foram feitos controles sem a adição de ácido ferúlico (controle biótico) e com ácido ferúlico, porém não inoculado com o microrganismo (controle abiótico).

3.6 FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA AVALIAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DO ÁCIDO FERÚLICO EM MEIO SINTÉTICO

O pré-inóculo foi preparado em meio nutritivo com adição de ácido ferúlico com a concentração de 300 mg L^{-1} , o qual foi incubado a 28°C , com agitação em incubadora orbital a 150 rpm. O crescimento foi mensurado através de densidade óptica analisada em espectrofotômetro ($\text{DO } 600_{\text{nm}}$). Quando a cultura atingiu a $\text{DO } 600_{\text{nm}} = 0,8$, dessa suspensão foi utilizada 1 mL para inocular cada unidade experimental, tal inóculo foi centrifugado a $15000 \times g$ por 15 min., e lavado três vezes com solução salina 0,85% de NaCl e o *pellet* foi ressuspenso com o próprio meio de cultivo e inoculado na referente unidade experimental.

A fermentação submersa foi realizada em triplicatas, em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio mineral (BUSHNELL; HAAS, 1941), acrescido de 0,05% glicose e 300 mg L^{-1} (ou 0,03%) de ácido ferúlico. A cultura foi incubada a 28°C , num agitador rotativo a 150 rpm, durante 48 horas. Foram feitos controles com adição de glicose e sem a adição de ácido ferúlico (controle biótico) e com ácido ferúlico, porém não inoculado com o microrganismo (controle abiótico).

A cada 4 horas, nas primeiras 24 horas e a cada 8 horas até completar 48 horas, em uma câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas de 1 mL utilizadas para determinação do crescimento por absorvância a 600_{nm} e alíquotas de 5 mL que foram usadas para aferição das alterações de pH, determinação dos teores de glicose de acordo com Miller (1959); quantificação do ácido ferúlico e identificação e quantificação dos metabólitos da bioconversão (HPLC e GC-MS).

O rendimento molar da formação do produto por quantidade de ácido ferúlico consumido foi calculado, bem como a conversão de ácido ferúlico (%) foi expressa.

3.7 OBTENÇÃO DE ÁCIDO FERÚLICO A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR

3.7.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

O bagaço de cana-de-açúcar, disponibilizado pela Usina Itajobi LTDA. – Açúcar e Alcool (Itajobi-SP), foi recebido em agosto de 2017 na forma *in natura* (úmido e prensado). O

preparo deste substrato envolveu uma série de lavagens utilizando água corrente (5 ciclos) para retirada dos açúcares provenientes da moagem para retirada do caldo. Na sequência, o bagaço foi seco em estufa com circulação de ar a $40 \pm 2^\circ \text{C}$, por aproximadamente 120 horas até atingir teor de umidade inferior a 5% (m/v). O bagaço seco foi triturado (triturador TRAPP® 400) e peneirado para a padronização do tamanho das partículas inferior a 2,83 mm de comprimento e superior a 1,41mm de comprimento (Figura 9), e armazenado em temperatura ambiente e livre de umidade para uso posterior.

FIGURA 9 - BAGAÇO DE CANA IN NATURA (I) E PROCESSADO (II)



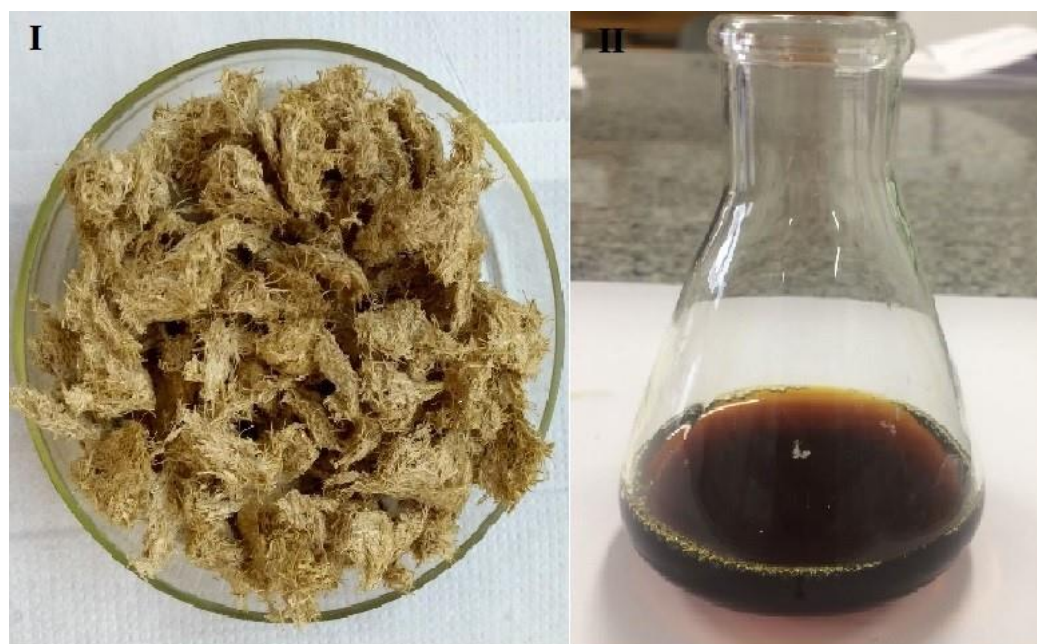
Fonte: autor.

3.7.2 HIDRÓLISE ALCALINA DO BAGAÇO

A hidrólise do bagaço foi realizada segundo metodologia descrita por Zhuang e colaboradores (2009). O bagaço de cana-de-açúcar previamente preparado foi levado a autoclave, em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de bagaço acrescido de solução alcalina de 0,5M de NaOH (5% m/v), ou seja para cada 5 g de bagaço foram usados 2 g de NaOH. O frasco Erlenmeyer foi vedado com papel alumínio e mantido sob temperatura de 120°C , durante 1 hora, a 1 atm.

Após este procedimento, o frasco foi mantido em banho de água gelada para resfriamento e, posteriormente, mantido sob temperatura ambiente. Em seguida, o material foi filtrado e a fase líquida foi armazenada para posterior análise de quantificação do ácido ferúlico por cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Tec., modelo 1220 Infinity LC (HPLC)) e quanto à presença de açúcares redutores, através da técnica de cromatografia de troca iônica HPAEC-PAD Thermo Scientific (Dionex) ICS-5000), com a finalidade de avaliar a extensão da degradação da celulose e hemicelulose. A fase sólida foi seca a 40°C e armazenada a temperatura ambiente para posterior utilização (Figura 10).

FIGURA 10 - BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDO A TRATAMENTO ALCALINO APÓS SECAGEM (I) E LÍCOR RESULTANTE (II)



Fonte: Autor

3.7.3 QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO PRESENTE NO LÍCOR

Uma alíquota de 15 ml foi previamente neutralizada até pH 7,0 com ácido clorídrico 5 M. Com a neutralização do pH, ocorreu precipitação de materiais que, após

centrifugação $15000 \times g$ por 15 min., foi filtrado em membrana de $0,22 \mu\text{m}$, e $20 \mu\text{L}$ foi aplicado no cromatógrafo Agilent Tec., modelo 1220 Infinity LC.

3.8 FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA AVALIAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DO ÁCIDO FERÚLICO PRESENTE NO LÍCOR

O pré-inóculo foi preparado em meio nutritivo com adição de ácido ferúlico sob a concentração de 300 mg L^{-1} , o qual foi incubado a 28°C , com agitação em incubadora orbital a 150 rpm, o crescimento foi mensurado através de densidade óptica analisada em espectrofotômetro ($\text{DO } 600_{\text{nm}}$). Quando a cultura atingiu a $\text{DO } 600_{\text{nm}} = 0,8$, dessa suspensão foi utilizada 1 mL para inocular cada unidade experimental, tal inóculo foi centrifugado a $15000 \times g$ por 15 min., e lavado três vezes com solução salina 0,85% de NaCl e o *pelet* foi ressuspendido com o próprio meio de cultivo e inoculado na referente unidade experimental.

A fermentação submersa foi realizada em triplicatas, em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de lícor acrescidos de meio mineral (BUSHNELL; HAAS, 1941), de 0,05% glicose. A cultura foi incubada a 28°C , num agitador rotativo a 150 rpm, durante 48 horas. Foi feito controle não inoculado com o microrganismo (controle abiótico).

A cada 4 horas, nas primeiras 24 horas e a cada 8 horas até completar 48 horas, em câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas de 1 mL utilizadas para determinação do crescimento por absorbância a 600_{nm} e alíquotas de 5 mL que foram usadas para aferição das alterações do pH, determinação dos teores de glicose (cromatografia de troca iônica HPAEC-PAD Thermo Scientific-Dionex ICS-5000); quantificação do ácido ferúlico e quantificação de 4-vinilguaiacol (HPLC e GC-MS).

O rendimento molar da formação do produto por quantidade de ácido ferúlico consumido foi calculado, bem como a conversão de ácido ferúlico (%) foi expressa.

3.9 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRESENÇA DE ENZIMA ÁCIDO FERÚLICO DESCARBOXILASE

A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi determinada no material extracelular (meio de cultivo), intracelular (extrato celular) e de parede celular

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, o pré-inóculo foi preparado em meio nutritivo com adição de ácido ferúlico sob a concentração de 300 mg L^{-1} , incubado a 28°C , com agitação em incubadora orbital a 150 rpm, o crescimento mensurado através de densidade óptica analisada em espectrofotômetro ($\text{DO } 600_{\text{nm}}$). Quando a cultura atingiu a $\text{DO } 600_{\text{nm}} = 0,8$, dessa suspensão foi utilizada 1 mL para inocular cada unidade experimental, tal inóculo foi centrifugado a $15000 \times g$ por 15 min., e lavado três vezes com solução salina 0,85% de NaCl e o *pellet* foi ressuscitado com o próprio meio de cultivo e inoculado na referente unidade experimental.

A fermentação submersa foi realizada em erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL de meio líquido mineral (BUSHNELL; HAAS, 1941), acrescido de 0,05% glicose e 300 mg L^{-1} de ácido ferúlico. A cultura foi incubada a 28°C , num agitador rotativo a 150 rpm, durante 24 horas. Foi feito controle não inoculado com o microrganismo (controle abiótico).

A partir deste material foi retirado 15 ml para o preparo de cada um dos extratos enzimáticos de acordo com as metodologias descritas abaixo.

Extracelular: a amostra do meio de cultivo foi centrifugada a $15000 \times g$ por 15 min. e o sobrenadante filtrado em filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e armazenado.

Intracelular: a amostra foi centrifugada a $15000 \times g$, 4°C , por 15 minutos; o sobrenadante descartado e a biomassa lavada duas vezes com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), o sobrenadante descartado e o *pellet* novamente ressuscitado no tampão citado acima, acrescido de 1mM de Ditioneitol, em volume suficiente para manter tal solução sob a concentração de $0,2 \text{ g mL}^{-1}$ de biomassa úmida. Essa suspensão de biomassa foi mantida em banho de ultrassom 4 vezes por 30 segundos a 20 kHz com intervalos de 15 segundos. Os tubos sempre foram mantidos em banho de gelo. O lisado bacteriano foi centrifugado a $15000 \times g$, a 4°C , por 15 minutos e usado como solução enzimática e os pellets separados.

Extrato da parede celular: o *pellet* obtido acima foi ressuscitado em tampão centrifugado tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e centrifugado a $15000 \times g$, 4°C , por 15 minutos; o sobrenadante descartado e o *pellet* novamente ressuscitado em tampão centrifugado tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) adicionado de 1mM de Ditioneitol de forma a manter tal solução sob a concentração de $0,2 \text{ g mL}^{-1}$ (massa úmida/ vol).

Os ensaios de atividade enzimática foram conduzidos em triplicata, adicionando-se 0,1mL dos extratos (5% v/v) a 1,9 mL de uma solução composta de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido ferúlico e 1mM de Ditioneitol. A mistura reacional foi incubada a temperatura de 28°C , durante 30 minutos e 1 hora. A atividade da enzima ácido ferúlico descarboxilase foi medida pela

redução de ácido ferúlico e calculada pela formação de 4-vinilguaicol. Uma unidade de enzima foi definida pela produção de 1 μmol por minuto.

3.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.10.1 PADRÕES ANALÍTICOS

De acordo com a literatura, os possíveis metabólitos do ácido ferúlico são 12 compostos diferentes (ROSAZZA et al., 1995). Entretanto, para o presente trabalho foram selecionados 5 metabólitos (Tabela 2) por se tratar dos mais comumente encontrados em vias metabólicas bacterianas, a serem estudados na padronização da metodologia em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS). Todos os 5 metabólitos foram submetidos à análise em HPLC.

TABELA 2 - METABÓLITOS DESCRITOS COMO ENVOLVIDOS NA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO FERÚLICO POR BACTÉRIAS

Nomenclatura neste trabalho	Nome IUPAC
Catecol	Benzeno-1,2-diol
Guaiacol	2-methoxyphenol
4-vinilguaicol	4-Ethenyl-2-methoxyphenol
Ác. Vanílico	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid
Vanilina	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde

3.10.2 ANÁLISE DOS COMPOSTOS POR HPLC

Ácido ferúlico e seus metabólitos: Para acompanhar as variações da concentração do ácido ferúlico, bem como os metabólitos intermediários da bioconversão na cultura, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A cultura foi centrifugada a $15000 \times g$ por 15 min., o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 μm , e 20 μL foi injetado no cromatógrafo Agilent Tec., modelo 1220 Infinity LC, equipado com bomba

binária, amostrador automático, forno de coluna e um detector UV/VIS. A coluna usada foi uma C18 ZORBAX Eclipse Plus (4.6x250 mm), mantida a temperatura de 25 °C. A separação cromatográfica realizada utilizando fase móvel metanol:ácido acético:água (10: 2: 88 v/v) como solvente “A” e metanol:ácido acético:água (90: 2: 8 v/v) como solvente “B” (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2001).

Os tempos de retenção de cada composto foram determinados (Tabela 3) e as curvas de calibração foram realizadas nas concentrações de 2,5 a 300 mg L⁻¹ para o ácido ferúlico e metabólitos, o coeficiente de correlação foi de 0,999 para os compostos estudados. Tal coeficiente indicou que a metodologia utilizada neste trabalho teve um bom desempenho na quantificação do ácido ferúlico e seus metabólitos.

TABELA 3 - TEMPO DE RETENÇÃO DOS COMPOSTOS ANALISADOS EM HPLC

Composto	Tempo de retenção
Catecol	7,5 minutos
Ác. Vanílico	13,7 minutos
Vanilina	16,3 minutos
Guaiacol	18,0 minutos
4-vinilguaiacol	28,3 minutos

A confirmação dos metabólitos foi feita por adição de padrão a uma amostra específica, onde inicialmente foi calculada a área dos picos e assim adicionado o padrão do composto a ser identificado, verificando-se alteração na área do pico a ser identificado, respectivamente.

Açúcares: A quantificação dos açúcares do licor foi realizada por meio da cromatografia de troca iônica, utilizando-se o HPAEC-PAD Thermo Scientific ((Dionex) ICS-5000) com coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1, a 25°C, com eluentes preparados com água deionizada ultra pura 18 MΩ e degaseificada com N₂. O fluxo utilizado foi de 1 mL min⁻¹ com o solvente “A” (água ultra pura) e “B” (500 mM de NaOH), utilizando-se eluição em modo isocrático com 4% de B e 96% de A, durante 25 minutos. A amostra de licor foi centrifugada a 15000 × g por 15 min., o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 μm, diluído 50 vezes e injetado no cromatógrafo.

Metabólito 4-vinilguaiacol: A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foi utilizada para a confirmação do metabólito 4-vinilguaiacol. Foi concentrado 10 mL

de amostra com cartucho Agilent SampliQ C18, em 1 mL de diclorometano, em bomba a vácuo. Foi utilizado o cromatógrafo da marca Perkin Elmer modelo 680, acoplado a um detector de massas Perkin Elmer, modelo Clarus 600T, software turbo mass. A coluna cromatográfica utilizada foi a Elite-WAX da Perkin Elmer (30 × 0.25mm, 1µm), temperatura de forno ajustado para 40 °C (mantido por 1 minuto) acréscimo de 20 °C/min até 130 °C, acréscimo de 5 °C/min até 170 °C, acréscimo de 50 °C/min até 230 °C/min (mantido por 10 minutos), temperatura do injetor a 250 °C, temperatura da linha de transferência (transferliner) 250 °C, temperatura da fonte de ionização 180 °C.

Foi utilizado hélio como gás de arraste, 6 psi/min, modo de injeção splitless e o volume de amostras injetado foi de 1 µL. As amostras foram analisadas no modo Scan (40 a 350 m/z).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DO pH SOBRE O CRESCIMENTO DA BACTÉRIA TD 4.7

Foram realizados inicialmente, os cultivos da cepa em meio líquido contendo glicose para se determinar definir a temperatura e pH mais indicados para o crescimento, dentro da faixa testada. Observou-se que não houve diferenças entre as taxas de crescimento nos diferentes valores de pH testados. Entretanto, o crescimento foi maior a 28°C (Figura 12). Foram escolhidas as condições de pH 6,5 e 28°C para a continuidade dos ensaios.

FIGURA 11 - CURVAS DE CRESCIMENTO DA CEPA BACTERIANA TD 4.7 EM DIFERENTES VALORES DE pH, SOB A TEMPERATURA DE 25°C

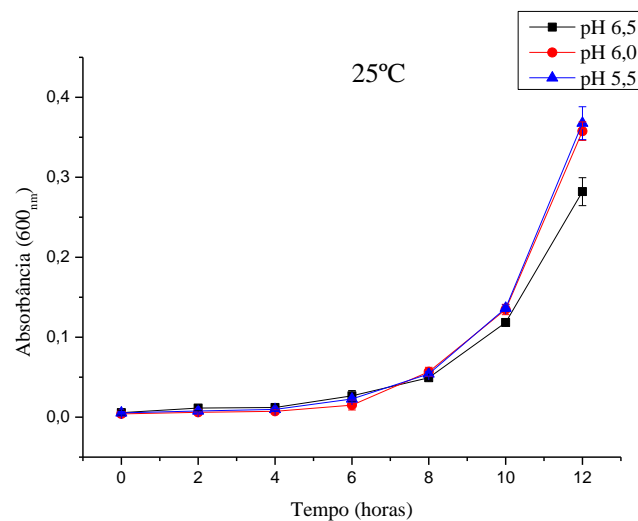


FIGURA 12 - CURVAS DE CRESCIMENTO DA CEPA BACTERIANA TD 4.7 EM DIFERENTES VALORES DE pH, SOB A TEMPERATURA DE 28°C

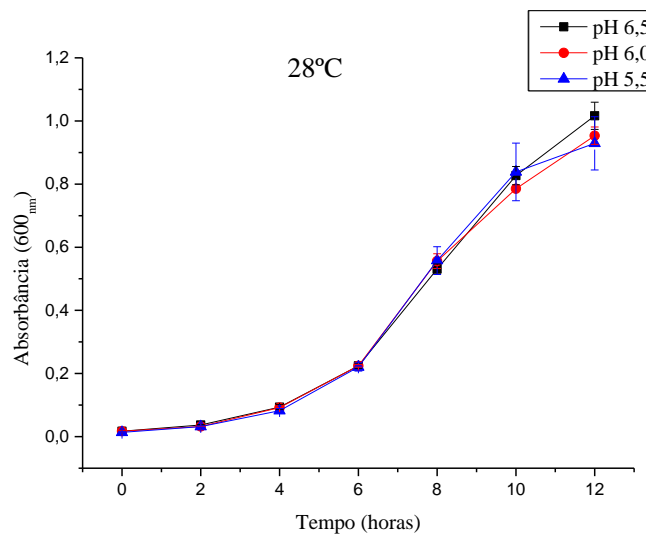
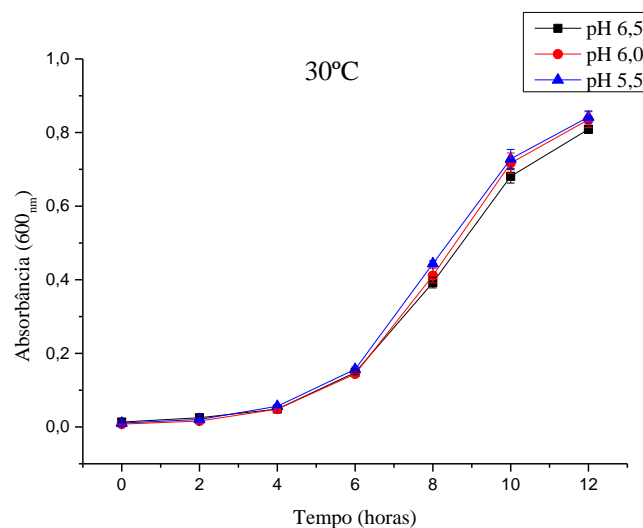


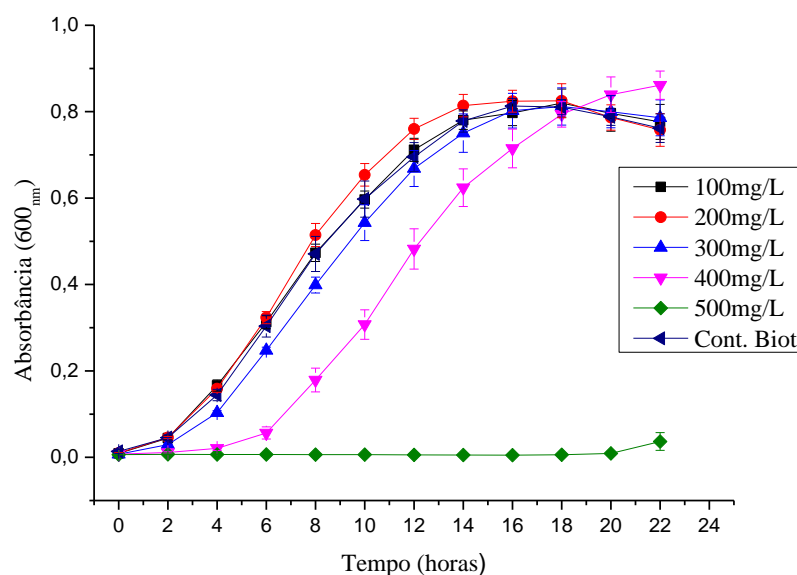
FIGURA 13 - CURVAS DE CRESCIMENTO DA CEPA BACTERIANA TD 4.7 EM DIFERENTES VALORES DE pH, SOB TEMPERATURA DE 30°C



4.2 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA BACTÉRIA AO ÁCIDO FERÚLICO

Uma vez que este estudo teve a finalidade de avaliar se a bactéria seria capaz de bioconverter ácido ferúlico foi necessário verificar qual o nível de tolerância da mesma ao composto. Para isso a cepa foi cultivada nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹ e o crescimento foi mensurado.

FIGURA 14 - EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO FERÚLICO, SOBRE O CRESCIMENTO DA CEPA BACTERIANA EM MEIO LIQUIDO NUTRITIVO A 28°C, PH 6,5.



Comparando-se o crescimento bacteriano em diferentes concentrações de ácido ferúlico com o meio controle, o qual não havia a presença de ácido ferúlico, conclui-se que não houve efeito significativo sobre o crescimento até a concentração de 300 mg L⁻¹. Em concentração do ácido ferúlico de 400 mg L⁻¹ ficou visível um aumento da fase lag de 2 para 6h, embora não ocorreu diminuição do crescimento bacteriano após esse período. O modelo de curva de crescimento nos meios com 400 mg L⁻¹ mostra que a bactéria possivelmente acionou deve acionar mecanismos adaptativos para reduzir a toxicidade do meio, retardando a aceleração do crescimento.

Em meio com 500 mg L⁻¹ de ácido ferúlico não houve crescimento indicando que essa concentração já atinge um nível de alta toxicidade para a bactéria superando sua capacidade de desintoxicar o meio (Figura 14).

Padrões de inibição diferentes foram reportados por Chesson e colaboradores (1982) em estudo com a bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* B834 cujo crescimento foi inibido com 1,94 g L⁻¹ de ácido ferúlico,. Por outro lado, estudo realizado por Lemos e colaboradores (2014) mostrou que os crescimentos de *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens* foram inibidos com 500 mg L⁻¹, a mesma concentração determinada como inibitória do crescimento de *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 por Lee e colaboradores (2015). Neste último

trabalho ensaios de microarranjo evidenciaram uma rápida expressão de genes, como do transporte de íons através da membrana. Tem sido relatado que o ácido ferúlico atua como um desacoplador devido à sua hidrofobicidade e, portanto, diminui o gradiente de pH através da membrana da célula, provocando mudança na força protomotiva e afetando a síntese de ATP. Além disso, os genes relacionados com sistemas de efluxo e proteínas de choque térmico também foram expressos. Esses dados confirmam que a tolerância e/ou bioconversão bacteriana do ácido ferúlico requer a expressão diferenciada de genes.

A toxicidade do ácido ferúlico para muitos microrganismos muitas vezes permite que ele seja usado como antimicrobiano (LEMOS et al., 2014). Seu mecanismo de inibição de crescimento, conforme discutido anteriormente, se dá pela desestabilização e permeabilização da membrana celular, com interferência na força protomotiva e inibição de enzimas relacionadas à produção de energia. Por ser um composto de natureza parcialmente lipofílica, atravessa a membrana celular por meio de difusão passiva. Além das alterações de membrana, possivelmente altera o citoplasma (CAMPOS et al., 2009b; LEMOS et al., 2014; LEE et al., 2015).

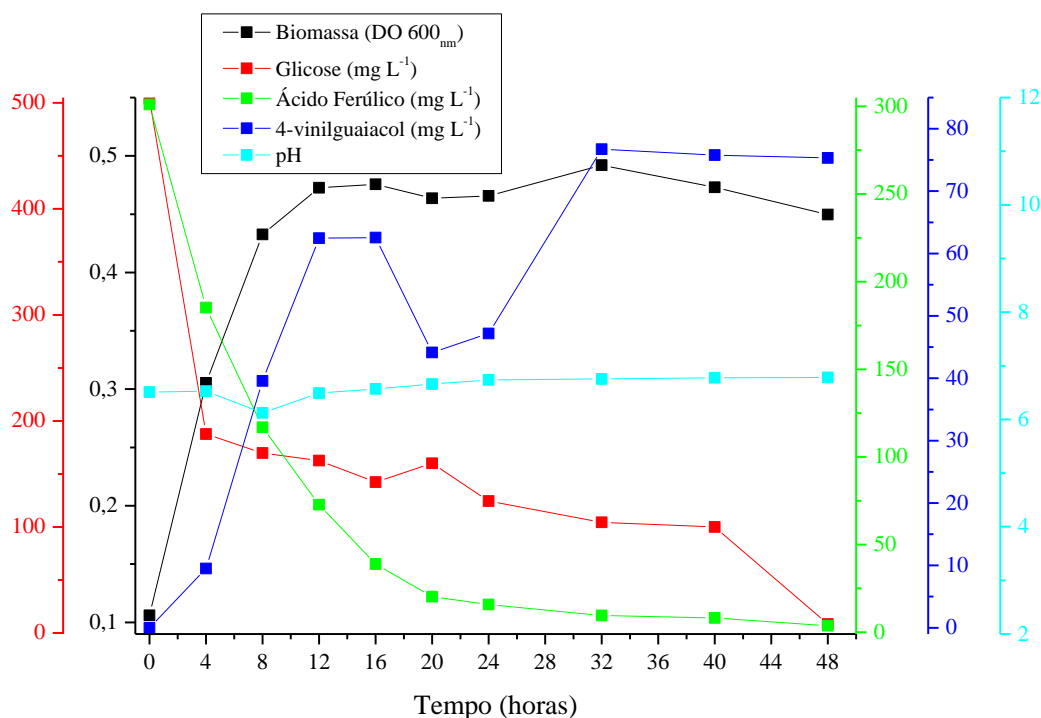
4.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA AVALIAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DO ÁCIDO FERÚLICO PRESENTE EM MEIO SINTÉTICO

Durante o cultivo da cepa bacteriana foi mensurado o crescimento em espectrofotômetro (DO_{600nm}); quantificado a glicose, quantificado o ácido ferúlico e os metabólitos e as alterações de pH; com amostragens nos tempos 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40 e 48 horas.

A partir da equação da curva, foi calculada a concentração de ácido ferúlico existente, usando técnica cromatografia líquida de alta eficiência. As concentrações de ácido ferúlico calculadas permitiram observar que a cepa apresenta capacidade de reduzir a concentração de tal composto de forma rápida, onde em 24 horas de cultivo 95% do ácido ferúlico já não estava mais disponível no meio.

A Figura 15 mostra as concentrações de ácido ferúlico e 4-vinilguaiacol, concentração de glicose, crescimento da bactéria e alterações de pH.

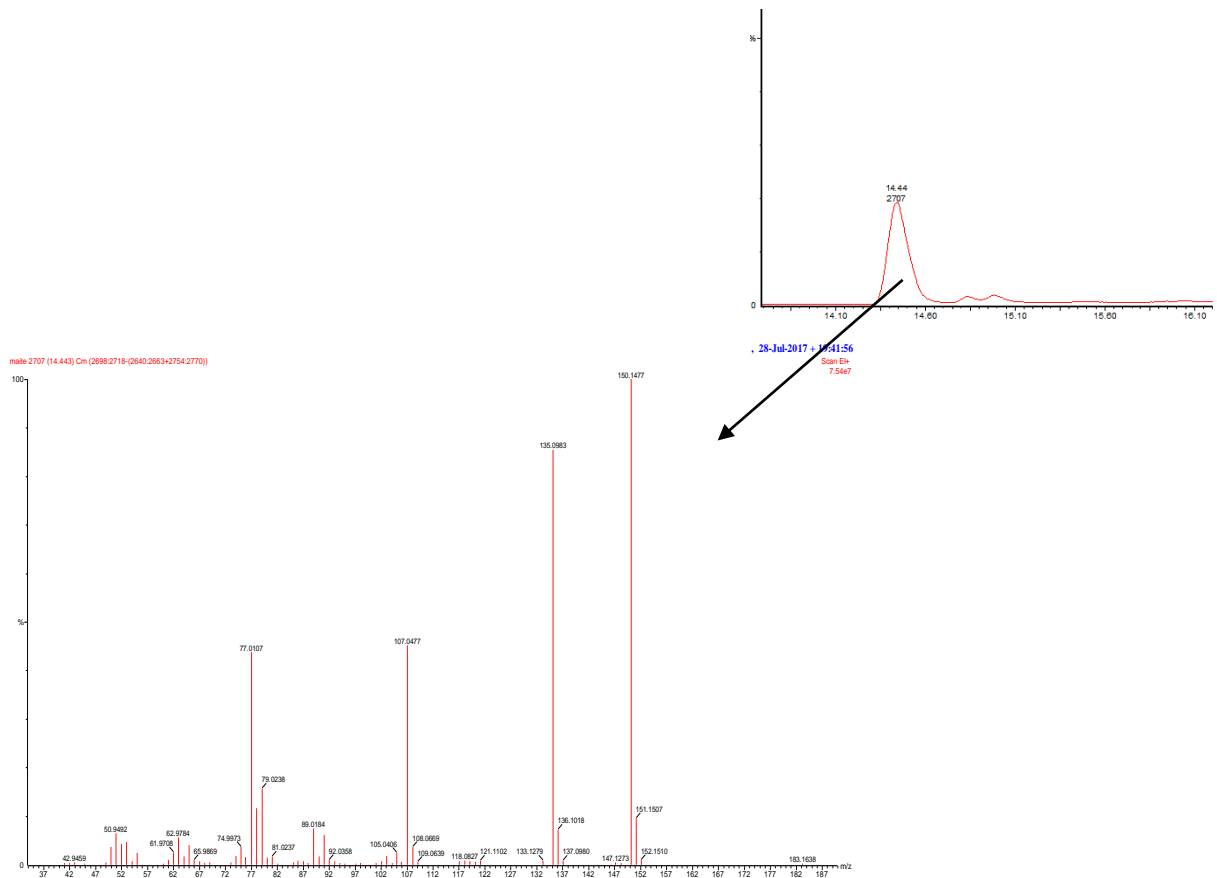
FIGURA 15 - PERFIL DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA, VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE, ÁCIDO FERÚLICO, 4-VINILGUAIAICOL, E DE pH



As curvas da Figura 15 evidenciam uma sincronização entre o consumo de glicose e ácido ferúlico e produção de biomassa nas 4 primeiras horas de crescimento, sendo que após esse período, mesmo com a interrupção no consumo de glicose, o crescimento continua acelerado. Nota-se que o desaparecimento do ácido ferúlico é contínuo desde o início do cultivo atingindo 100% em 48 horas. Após- 4 horas, inicia-se o consumo 4-vinilguaiaicol. Um possível uso do ácido ferúlico como fonte de carbono pela bactéria após a exaustão da glicose, a partir de seu intermediário 4-vinilguaiaicol corrobora os dados de Borneman e colaboradores (1986). De acordo com Mathew e colaboradores (2007), monômeros fenólicos quando não utilizados como fonte de carbono sofrem alterações dentro das células, como a descarboxilação, de modo a reduzir os níveis de toxicidade. O acúmulo máximo de 4-vinilguaiaicol ($76,72 \text{ mg L}^{-1}$) foi atingido em 32 horas de cultivo, bem como a redução de ácido ferúlico para níveis de $9,58 \text{ mg L}^{-1}$.

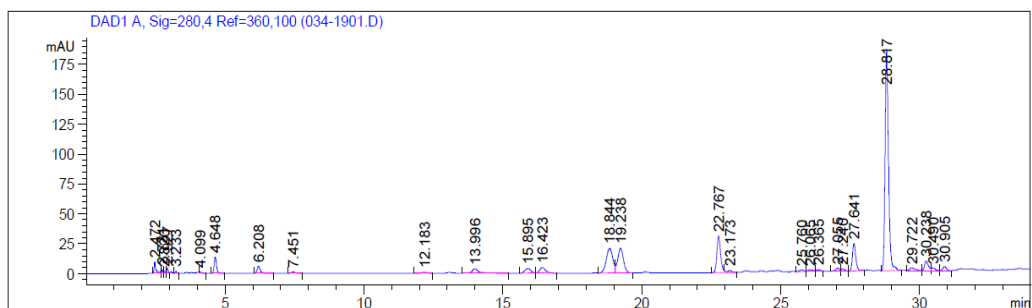
A confirmação da formação de 4-vinilguaiaicol em espectrômetro de massas está ilustrada na Figura 16.

FIGURA 16 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTES AO 4-VINILGUAIACOL



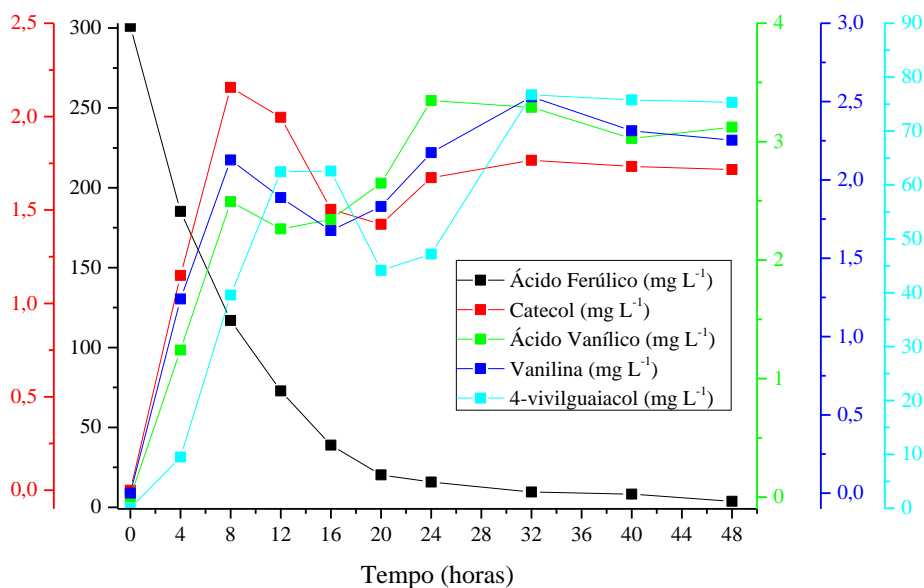
A presença dos sinais cromatográficos no tempo de retenção de cada metabólito como descrito na (tabela 2), foi observada no cultivo (figura 17).

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA, OBTIDO DE AMOSTRAS DO MEIO APÓS 24 HORAS DE CULTIVO, PICOS: 7,45 MIN. - CATECOL; 13,99 MIN. - ÁC. VANILICO; 16,42 MIN. - VANILINA; 22,76 MIN. - ÁC. FERÚLICO E 28,81 MIN. - 4-VINILGUAIACOL



A Figura 18 mostra as concentrações de ácido ferúlico, 4-vinilguaiacol, vanilina, ácido vanílico e catecol, em função do tempo durante o cultivo de TD 4.7, conforme quantificado por HPLC.

FIGURA 18 - CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS NO MEIO EM FUNÇÃO DO TEMPO



Li e colaboradores (2008), encontraram as mesmas características de produção de 4-vinilguaiacol, quando do cultivo da *Enterobacter sp.* Px6-4. Os teores de 4-vinilguaiacol aumentaram junto com o crescimento microbiano em fase *log* e depois diminuíram gradativamente com o início da fase estacionária, sofrendo alterações de concentração. Esses autores detectaram a atividade intracelular da enzima ácido ferúlico descaboxilase durante esse período, num cultivo feito em meio de sais suplementado com 1 g L⁻¹ de ácido ferúlico, a atividade da enzima estava diretamente relacionada com os teores de 4-vinilguaiacol.

Uma grande concentração de 4-vinilguaiacol e uma pequena concentração de vanilina no início do cultivo também foi relatado por Li e colaboradores (2008) que observaram que a medida que a fase estacionária avança a concentração de vanilina aumenta gradualmente bem como dos demais metabólitos, associada a grandes concentrações de do 4-vinilguaiacol.

A Tabela 4 mostra os valores de conversão e rendimento obtidos para a cepa após 32 horas de cultivo, tempo no qual se encontra o maior pico de produção de 4-vinilguaiacol.

TABELA 4 - RENDIMENTO DA CONVERSÃO DE ÁCIDO FERÚLICO EM 4-VINILGUAIACOL APÓS 32 HORAS DE INCUBAÇÃO.

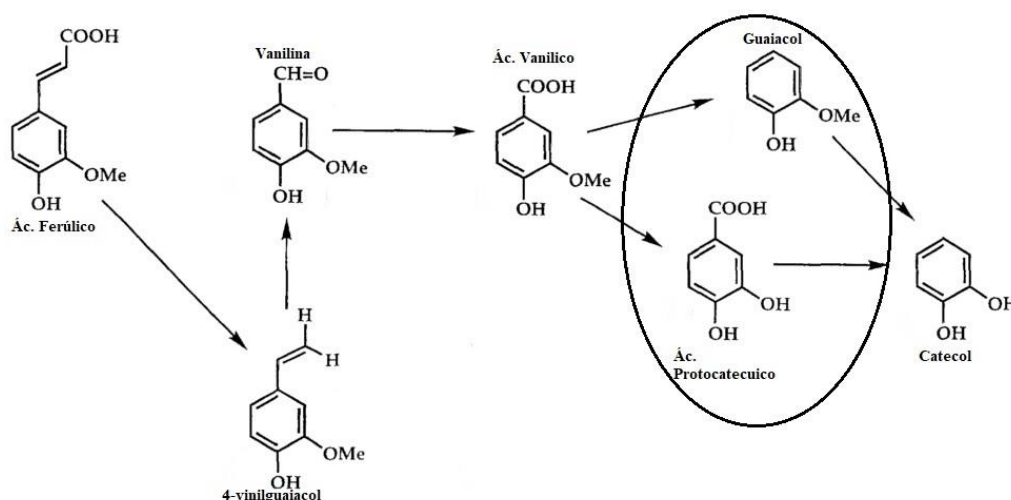
Conversão	
Conversão de AF (%)	32,4
Rend. de 4-VG/AF	0,5 mmol L ⁻¹

Nota: AF = Ácido ferúlico, 4-VG = 4-vinilguaiacol

Foi observada uma conversão de ácido ferúlico de 32 % (Tabela 4) e obteve-se uma concentração máxima de 4-vinilguaiacol de 76,72 mg L⁻¹, proporcionando um rendimento de 0,5 mmol L⁻¹ em 32 horas de cultivo.

Ainda que em seu pico de produção, foram detectadas baixas concentrações de vanilina (2,31 mg L⁻¹), ácido vanílico (3,29 mg L⁻¹), e catecol (2,15 mg L⁻¹). Karmakar e colaboradores (2000), propôs que na rota metabólica utilizada pela cepa de *Bacillus coagulans* o ácido ferúlico é descarboxilado a 4-vinilguaiacol, convertido em vanilina, e posteriormente oxidado a ácido vanílico, desmetilado a ácido protocatecuico, seguido de catecol. Neste trabalho devido a não identificação do ácido protocatecuico, bem como do guaiacol, ainda não é possível descrever a via metabólica seguida pelo microrganismo. Na Figura 19 encontra-se uma representação das possíveis rotas de acordo com a literatura.

FIGURA 19 - PROPOSTA DE VIA METABÓLICA UTILIZADA PELA CEPA BACTERIANA PARA CONVERSÃO DO ÁCIDO FERÚLICO



Fonte: adaptado de (ROSAZZA et al., 1995)

4.4 OBTENÇÃO DE ÁCIDO FERÚLICO A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR

Após o tratamento alcalino do bagaço de cana, obteve-se uma fração sólida e uma fração líquida. A fração líquida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação da concentração de ácido ferúlico, bem como para a presença de açúcares redutores, através da técnica de cromatografia de troca iônica HPAEC-PAD Thermo Scientific (Dionex) ICS-5000). Na Tabela 5 encontram-se os dados obtidos após a análise do lícor.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDO FERÚLICO DO LÍCOR OBTIDO POR TRATAMENTO ALCALINO DO BAGAÇO DE CANA.

Compostos quantificados	
Ácido ferúlico (mg L ⁻¹)	310,14
Glicose (mg L ⁻¹)	ND
Xilose (mg L ⁻¹)	ND
Nota: ND – não detectado	

Apesar de a hidrólise alcalina proporcionar uma solução rica em ácidos fenólicos apenas o ácido ferúlico foi quantificado, a quantidade obtida após hidrólise alcalina corrobora o estudo de extração e quantificação de ácidos fenólicos a partir de biomassa lignocelulósica realizado por Salgado e colaboradores (2012) que obteve uma concentração de 312 mg L⁻¹ de ácido ferúlico para gramíneas.

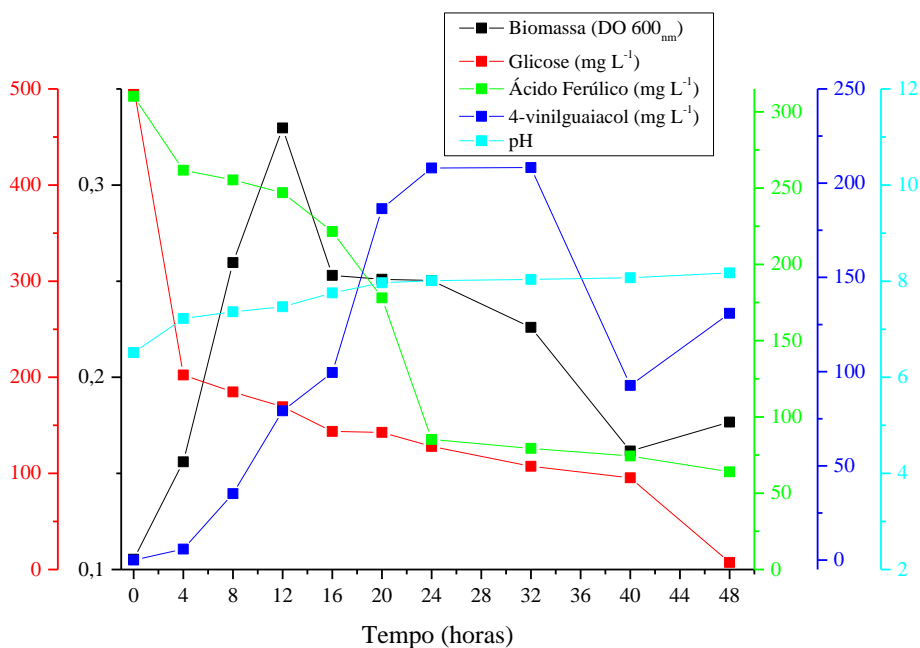
4.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA AVALIAÇÃO DA BIOCONVERSÃO DO ÁCIDO FERÚLICO EM LÍCOR

Durante o cultivo da cepa bacteriana foi mensurado o crescimento em espectrofotômetro (DO 600_{nm}); quantificado a glicose, quantificado o ácido ferúlico e 4-vinilguaiacol e as alterações de pH; com amostragens nos tempos 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40 e 48 horas.

A Figura 20 mostra as concentrações de ácido ferúlico e 4-vinilguaiacol (conforme quantificado por HPLC), concentração de glicose, crescimento da bactéria (DO 600_{nm}) e alterações de pH.

A partir das concentrações de ácido ferúlico observadas foi possível verificar que a bactéria apresenta capacidade de reduzir a concentração de tal composto também em lícor obtido de tratamento alcalino. Em 24 horas de cultivo 72,5 % do ácido ferúlico foi consumido.

FIGURA 20 - PERFIL DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA, VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE, ÁCIDO FERÚLICO E DE 4-VINILGUAIAICOL, VARIAÇÕES DE pH



A cepa cresceu rapidamente entre 0 e 12 horas, atingindo fase estacionária entre 12 e 16 horas, quando da bioconversão de ácido ferúlico a 4-vinilguaiaicol, é possível observar que em 24 horas a concentração atinge seu pico de 208,06 mg L⁻¹ de 4-vinilguaiaicol,

TABELA 6 - RENDIMENTO DA CONVERSÃO DE ÁCIDO FERÚLICO EM 4-VINILGUAIAICOL APÓS 32 HORAS DE INCUBAÇÃO.

Conversão	
Conversão de AF (%)	81,7
Rend. de 4-VG/AF	1,3 mmol L ⁻¹
Nota: AF = Ácido ferúlico, 4-VG = 4-vinilguaiaicol	

Foi observada uma conversão de ácido ferúlico de 81,7 % (Tabela 6) e obteve-se uma concentração máxima de 4-vinilguaiaicol de 208,06 mg L⁻¹, proporcionando um rendimento de 1,3 mmol L⁻¹ em 24 horas de cultivo; apesar do lícor não ter sofrido

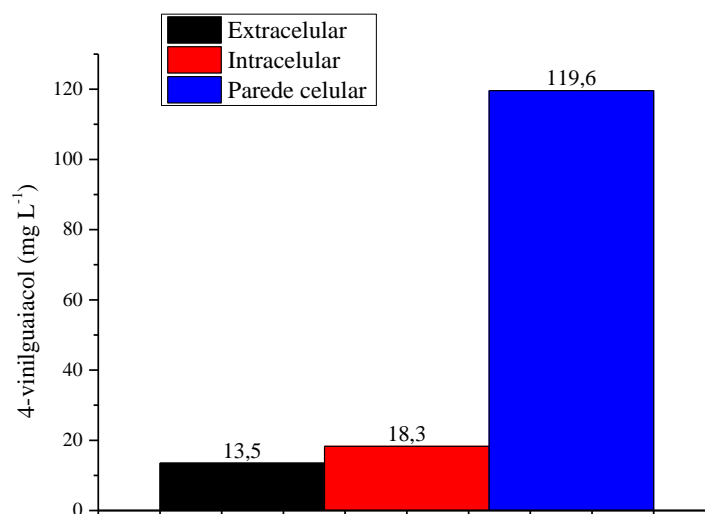
desintoxicação como no trabalho descrito por Salgado e colaboradores (2012), os resultados de bioconversão foram promissores evidenciando a capacidade da cepa de biotransformação mesmo em meio sem tratamento. Quanto ao crescimento é visível que o crescimento em lícor foi reduzido, quando comparado ao crescimento da cepa em meio líquido mineral, é possível que a inibição do meio seja maior devido a presença de outros compostos fenólicos no meio.

4.6 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRESENÇA DE ENZIMA ÁCIDO FERÚLICO DESCARBOXILASE

A atividade de descarboxilação não oxidante de ácidos aromáticos ocorre em uma variedade de microrganismos e é de interesse para bioprocessamento e engenharia metabólica. Quando da confirmação da presença de ácido ferúlico descaboxilase, foi verificada a presença intracelular, extracelular e de parede, através da formação de 4-vinilguaiacol (BHUIYA et al., 2015).

Quanto aos testes de atividade enzimática de ácido ferúlico descarboxilase, a qual é responsável pela descaboxilação de ácido ferúlico a 4-vinilguaiacol, inicialmente foram mensuradas as concentrações de substrato e produto (Figura 21), ficou evidente nos ensaios enzimáticos a maior presença da enzima no material de parede celular do microrganismo visto que obteve-se 2000 U g^{-1} de atividade nas condições testadas, é possível observar que há formação do produto nos extratos extra e intracelulares, obtendo 40 U mL^{-1} e 80 U mL^{-1} , respectivamente. A partir destes resultados é possível inferir que a enzima em sua grande parte é um componente estrutural das paredes da célula.

FIGURA 21 - PERFIL DE FORMAÇÃO DE 4-VINILGUAIACOL EM REAÇÃO ENZIMÁTICA EM EXTRATO EXTRACELULAR, INTRACELULAR E DE PAREDE CELULAR



Embora as descarboxilases de ácido fenólico forneçam ferramentas úteis para aplicações bioindustriais, essas enzimas apenas começam a ser examinadas. Degrassi e colaboradores (1995), quando do estudo com *B. pumilus* PS213, após utilização de meio de indução com a presença de ácido ferúlico, com a produção e atividade da ácido ferúlico descarboxilase, a análise por HPLC mostrou tempos de retenção semelhantes para o 4-vinilguaiacol que é produto de degradação do ácido ferúlico, como descrito neste trabalho. Demonstrou ainda que a produção desta enzima parece ser induzida pela presença de ácido ferulico no meio de cultivo, isto implica que esta função de descarboxilase representa um passo do metabolismo secundário que poderia ter evoluído em resposta à toxicidade deste.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. A cepa tolera até 300 mg L⁻¹ de ácido ferúlico sem ter seu crescimento alterado;
2. A bactéria foi capaz de converter 32,4 % do meio mineral suplementado com 300 mg L⁻¹ de ácido ferúlico a 4-vinilguaiacol;
3. A hidrólise alcalina do bagaço de cana permitiu a obtenção de níveis de ácido ferúlico compatíveis com a capacidade de conversão da bactéria.
4. A bactéria é capaz de crescer em lícor suplementado com meio mineral.
5. A bactéria é capaz de converter ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol, em lícor, com um rendimento de 81,7 %.
6. A bactéria expressa a enzima ácido ferúlico descarboxilase e seu maior nível de atividade encontra-se nas estruturas da parede celular.

Referências

- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 23 fev. 2010.
- BERNINI, R. et al. Obtaining 4-vinylphenols by decarboxylation of natural 4-hydroxycinnamic acids under microwave irradiation. **Tetrahedron**, v. 63, n. 39, p. 9663–9667, set. 2007.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, set. 1951.
- BHUIYA, M. W. et al. Structure and Mechanism of Ferulic Acid Decarboxylase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 12, p. 4216–23, 15 jun. 2015.
- BORNEMAN, W. S. et al. Effect of Phenolic Monomers on Ruminal Bacteria. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 52, n. 6, p. 1331–1339, 1986.
- BRASÍLIA. Perfil do Setor do Açúcar e do Etanol no Brasil. 2017.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1542–1548, ago. 2009.
- BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. **Journal of bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653–73, maio 1941.
- CAMPBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). **Plant physiology**, v. 110, n. 1, p. 3–13, jan. 1996.
- CAMPOS, F. M. et al. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 144–151, 31 out. 2009.
- CHESSON, A.; STEWART, C. S.; WALLACE, R. J. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 44, n. 3, p. 597–603, set. 1982.
- CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 121–145, 15 jul. 2011.

- DAMASCENO, M. C. et al. A importância da Lignina para a Produção de Etanol de Segunda Geração. **Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010**, 2010.
- DEGRASSI, G.; POLVERINO DE LAURETO, P.; BRUSCHI, C. V. Purification and characterization of ferulate and p-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 1, p. 326–32, 1 jan. 1995.
- DONAGHY, J. A.; KELLY, P. F.; MCKAY, A. Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 453–456, 1 mar. 1999.
- FERREIRA-LEITÃO, V. et al. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65–76, 7 fev. 2010.
- FIorentino, A. et al. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1005–9, 12 fev. 2003.
- GILARDI, G. et al. **Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture**. [s.l.] Elsevier, 1990.
- GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, jul. 2010.
- GOWRI, G. et al. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.): X. Molecular Cloning and Expression of S-Adenosyl-L-Methionine:Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase, a Key Enzyme of Lignin Biosynthesis. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 97, n. 1, p. 7–14, 1 set. 1991.
- GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435–448, out. 1992.
- HATFIELD, R. D. et al. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, n. 1, p. 51–58, 1 maio 1994.
- HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 9 fev. 2007.
- HLASIWETZ, H.; BARTH, L. Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium in Innsbruck I) Ueber einige Harze [Zersetzungsproducte derselben durch schmelzendes Kali]. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v. 138, n. 1, p. 61–76, 1 jan. 1866.
- HUANG, H.-K. et al. Purification and properties of phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 55–62, 17 jan. 2012.
- HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of ferulic acid by

- Saccharomyces cerevisiae and Pseudomonas fluorescens. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2244–50, jul. 1993.
- HUNTER, W. J.; MANTER, D. K.; VAN DER LELIE, D. Biotransformation of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol by Enterobacter soli and E. aerogenes. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 752–757, 18 dez. 2012.
- JOSEPH, S.; ERNING, X. Ophthalmic solution with a flavoring agent. 2006.
- KARMAKAR, B. et al. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of Bacillus coagulans. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 195–202, 2000.
- KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 86–93, dez. 2014.
- LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3–4, p. 151–159, fev. 1999.
- LEE, I.-Y.; VOLM, T. G.; ROSAZZA, J. P. N. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by Bacillus pumilus in aqueous-organic solvent two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 3–4, p. 261–266, 1 ago. 1998.
- LEE, S.; LEE, J. H.; MITCHELL, R. J. Analysis of Clostridium beijerinckii NCIMB 8052's transcriptional response to ferulic acid and its application to enhance the strain tolerance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 68, 16 dez. 2015.
- LEMOES, M. et al. The effects of ferulic and salicylic acids on Bacillus cereus and Pseudomonas fluorescens single- and dual-species biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 86, p. 42–51, 2014.
- LI, X. et al. The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by Enterobacter sp. Px6-4 isolated from Vanilla root. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1132–1137, 2008.
- LINGER, J. G. et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 33, p. 12013–12018, 19 ago. 2014.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Studies on the production of feruloyl esterase from cereal brans and sugar cane bagasse by microbial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 565–570, 2005.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 115–125, 11 jan. 2006.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; SUDHEESH, S. Rapid conversion of ferulic acid to 4-

- vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 2, p. 48–52, fev. 2007.
- MO, X.; XU, Y. Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Chinese Rice Wine Brewing and Fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 3, p. 304–311, 2010.
- PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 27 jun. 2002.
- PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBÜCHEL, A. Biotechnological production of vanillin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 296–314, ago. 2001.
- RALPH, J. et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1–2, p. 29–60, jan. 2004.
- REN, N.-Q. et al. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H₂: Key challenges and new insights. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 92–99, 2016.
- RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. et al. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 249–257, abr. 2001.
- ROOPAN, S. M. An overview of natural renewable bio-polymer lignin towards nano and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 508–514, 2017.
- ROSAZZA, J. P. N. et al. Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 472–479, 1995.
- SALGADO, J. M. et al. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. **Industrial Crops & Products**, v. 39, p. 52–61, 2012.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, I. B.-P. A G. R.-S. A E. G.-Z. B C. A. C O. L. A G. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4721–4724, 1 jun. 2010.
- SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. 2016.
- TILAY, A. et al. Preparation of Ferulic Acid from Agricultural Wastes: Its Improved Extraction and Purification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p.

7644–7648, 10 set. 2008.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, jul. 2010.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1959–1966, dez. 2005.

XIAO-FENG SUN, †,§ et al. Extraction and Characterization of Original Lignin and Hemicelluloses from Wheat Straw. 2005.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 207–217, 2005.

ZHUANG, X. et al. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 578–582, 2009.