



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

Érike Jhonnathan Pereira

**Biotransformação bacteriana de ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol**

São José do Rio Preto  
2022

Érike Jhonnathan Pereira

## **Biotransformação bacteriana de ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes

Coorientador: Dr. Gustavo Metzker

São José do Rio Preto  
2022

P436b      Pereira, Érike Jhonnathan  
Biotransformação bacteriana de ácido p-cumárico a 4-vinilfenol /  
Érike Jhonnathan Pereira. -- São José do Rio Preto, 2022  
72 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio  
Preto

Orientadora: Eleni Gomes  
Coorientador: Gustavo Metzker

1. Microbiologia aplicada. 2. Bactéria. 3. Biotransformação de  
compostos aromáticos. 4. Ácido p-cumárico. I. Título.

Érike Jhonnathan Pereira

**Biotransformação bacteriana de ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eleni Gomes  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Rafael Mafra de Paula Dias  
UFSJ – Universidade Federal de São João del-Rei

Prof. Dr. Mauricio Boscolo  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
25 de abril de 2022

Dedico este trabalho de pesquisa a Deus, meus pais e todos aqueles que me apoiaram ao longo dessa jornada, dos quais eu compartilho essa conquista, com amor e gratidão eterna.

## **AGRADECIMENTOS**

À toda minha família querida, em especial aos meus pais e irmã, que não se ausentaram mesmo nos momentos mais difíceis, sempre me apoiando, independente da distância criada pela dedicação desta etapa da vida.

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

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eleni Gomes, pela dedicação nas correções e orientações neste período de aprendizado.

Ao meu coorientador Dr. Gustavo Metzker e ao Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva, pela paciência e pelas lições ensinadas, participando de modo definitivo da minha formação.

A todos meus companheiros de pós-graduação que transformaram o longo período de dedicação em algo mais divertido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço,

## RESUMO

A biomassa lignocelulósica (lignina, celulose e hemicelulose) oriunda da indústria sucroalcooleira (bagaço de cana-de-açúcar) é atualmente subutilizada para geração de calor através de sua queima em caldeiras para produção de energia elétrica. No entanto, essa biomassa pode se tornar uma fonte potencial para obtenção de açúcares fermentáveis e de compostos fenólicos, que também podem passar por processos de bioconversão para obtenção de compostos químicos de alto valor agregado. Dentre os compostos fenólicos presentes na biomassa de cana-de-açúcar, destaca-se o ácido *p*-cumárico (AC) que através de reação de descarboxilação pode ser convertido a 4-vinilfenol (4VF) sendo este um composto de alto valor agregado e de grande aplicabilidade na indústria de química fina. Logo, o presente trabalho propôs a biotransformação bacteriana do AC em 4VF em solução modelo. Das cinco cepas bacterianas estudadas, *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7 e 3 isoladas, entretanto, ainda não identificadas: TD 2.18.1, TD 2.18.2 e TG 4.48.2, somente a cepa *Ochrobactrum intermedium* mostrou-se capaz de tolerar concentrações de AC de até 300 mg L<sup>-1</sup>. A referida cepa consumiu 92% do AC inicial, com um rendimento de 92% de 4VF em 3 horas de fermentação. Experimentos realizados em meio de cultura sem glicose indicaram que a cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 continua sendo capaz de fazer a bioconversão, no entanto o consumo de AC (89%) apresentou uma pequena queda se comparado ao experimento que continha glicose, contudo, o rendimento se mantém em igual proporção.

**Palavras-chave:** Bactéria. Biotransformação de compostos aromáticos. Ácido *p*-cumárico.

## ABSTRACT

The lignocellulosic biomass (lignin, cellulose and hemicellulose) from the sugarcane industry (sugarcane bagasse) is currently underused for heat generation by burning it in boilers to produce electricity. However, this biomass can become a potential source for obtaining fermentable sugars and phenolic compounds, which can also undergo bioconversion processes to obtain high-added value chemicals. Among the phenolic compounds present in the sugarcane biomass, the *p*-coumaric acid (AC) which through decarboxylation reaction can be converted into 4-vinylphenol (4VF) is a high-added value compound with and great applicability in the fine chemical industry. Thus, the present work proposed the bacterial biotransformation of AC into 4VF in a model solution. Taking into account the five bacterial strains studied, *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7 and 3 isolated, however, not yet identified: TD 2.18.1, TD 2.18.2 and TG 4.48.2, only the *Ochrobactrum intermedium* strain was able to tolerate AC concentrations up to 300 mg L<sup>-1</sup>. The last- mentioned strain was able to consume 92% of the initial amount of AC, with a 92% yield of 4VF in 3 hours of fermentation. In medium without glucose, the bacterium *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 was also able to grow and bioconvert AC, but compared to the culture containing glucose, we noticed a reduction in AC conversion (89%), although the proportion in the experiment was similar.

**Keywords:** Bacterium. Biotransformation of aromatic compounds. *p*-Coumaric acid

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Composição do resíduo lignocelulósico.....  | 18 |
| <b>Figura 2</b> – Representação esquemática do bioprocessamento dos resíduos lignocelulósicos.....  | 19 |
| <b>Figura 3</b> – Estruturas químicas dos precursores que constituem a lignina.....   | 21 |
| <b>Figura 4</b> – Fragmentação da lignina em derivados de baixa massa molecular.....  | 22 |
| <b>Figura 5</b> – Estrutura química do fenol.....   | 24 |
| <b>Figura 6</b> – Metabolismo primário e secundário das plantas.....  | 25 |
| <b>Figura 7</b> – Estrutura química do ácido cinâmico.....  | 26 |
| <b>Figura 8</b> – Síntese de ácido cinâmico na via fenilpropanoide catalisada pela enzima PAL.....  | 27 |
| <b>Figura 9</b> – Estrutura química do ácido <i>p</i> -cumárico (AC).....   | 28 |
| <b>Figura 10</b> – Síntese de ácido <i>p</i> -cumárico na via fenilpropanoide catalisada pela enzima 4HC.....   | 29 |
| <b>Figura 11</b> – Aplicações comerciais de 4VF e seus derivados em vários setores da indústria.....  | 31 |
| <b>Figura 12</b> – Desidrogenação catalítica do 4-etilfenol à 4VF.....  | 31 |
| <b>Figura 13</b> – Condensação Knoevenagel-Doeber de benzaldeídos na geração de 4VF.....  | 32 |
| <b>Figura 14</b> – Vias de biotransformação do AC em bactérias e fungos para outros compostos aromáticos derivados.....   | 33 |
| <b>Figura 15</b> – Atividade catalítica da enzima descarboxilase.....   | 34 |
| <b>Figura 16</b> – Colônias das cepas (A) <i>O. intermedium</i> TG 3.48, (B) <i>S. acidaminiphila</i> TD 4.7, (C) TD 2.18.1, (D) TD 2.18.2 e (E) TG 4.48.2..... | 36 |
| <b>Figura 17</b> – Gradiente de eluição da fase B do método cromatográfico.....   | 39 |
| <b>Figura 18</b> – Curva de crescimento das cepas (A) <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48 e (B) <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> TD 4.7.....          | 41 |
| <b>Figura 19</b> – Curva de crescimento das cepas não identificadas (C) TD 2.18.1 e (D) TD 2.18.2.....  | 42 |
| <b>Figura 20</b> – Curva de crescimento da cepa não identificada (E) TG 4.48.2.....   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 21</b> – Cromatogramas referentes aos padrões dos reagentes AC (A), 4VF (B) em conjunto da obtida durante a bioconversão da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48 (C) em uma hora de fermentação..... | 45 |
| <b>Figura 22</b> – Screening da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48, mensurando o crescimento bacteriano, alteração do pH, em conjunto das variações na concentração de AC e glicose disponíveis no meio..... | 46 |
| <b>Figura 23</b> – Perfil de crescimento bacteriano da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48, consumo de AC, formação de 4VF, e pH em meio de cultura acrescido de glicose.....                                 | 47 |
| <b>Figura 24</b> – Perfil de crescimento bacteriano da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48, consumo de AC, formação de 4VF, e pH em meio de cultura ausente de glicose.....                                   | 52 |
| <b>Figura 25</b> – Vias de biotransformação do AC em bactérias e geração de compostos aromáticos derivados.....  | 53 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Comparação entre estudos de biotransformação de cepa bacterianas de CA a 4FV sob meios de cultivo e condições variadas..... | 50 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>3HC</b>                | 3-hidroxilase do cumarílico/coumaryl 3-hydroxylase                               |
| <b>4HC</b>                | 4-hidroxilase do ácido cinâmico/cinnamic acid 4-hydroxylase                      |
| <b>4VF</b>                | 4-vinilfenol/4-vinylphenol   |
| <b>5HF</b>                | 5-hidroxilase do ferúlico/ferulic 5-hydroxylase                                  |
| <b>AC</b>                 | Ácido <i>p</i> -cumárico/ <i>p</i> -coumaric acid                                |
| <b>AF</b>                 | Ácido ferúlico/ferulic acid  |
| <b>AFMT</b>               | ácido cafeico orto-metiltransferase/caffeic acid ortho-methyltransferase         |
| <b>CA</b>                 | Controle abiótico  |
| <b>CB</b>                 | Controle biótico   |
| <b>CIM</b>                | Concentração inibitória mínima/minimum inhibitory concentration                  |
| <b>CLAE</b>               | Cromatografia líquida de alta performance/high performance liquid chromatography |
| <b>DO<sub>600nm</sub></b> | Densidade ótica em 600 nanômetros  |
| <b>FAL</b>                | Fenilalanina amônia-liase/phenylalanine ammonia-lyase                            |
| <b>Fdc1</b>               | Ácido ferúlico descarboxilase/ferulic acid decarboxylase                         |
| <b>MLN</b>                | Meio líquido nutritivo/nutritive liquid medium                                   |
| <b>MLM</b>                | Meio líquido mineral/mineral liquid medium                                       |
| <b>PAD</b>                | Ácido fenólico descarboxilase/phenolic acid decarboxylase                        |
| <b>Pdc1</b>               | Ácido <i>p</i> -cumárico descarboxilase/ <i>p</i> -coumaric acid decarboxylase   |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| <b>1.1 Objetivos</b> .....   | 17 |
| 1.1.1 Gerais.....  | 17 |
| 1.1.2 Específicos.....   | 17 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | 18 |
| 2.1 Produção de resíduos lignocelulósicos .....  | 18 |
| 2.2 Lignina e seu potencial na geração de valor agregado .....   | 20 |
| 2.3 Compostos fenólicos .....  | 24 |
| 2.4 Ácidos cinâmicos.....  | 26 |
| 2.5 Ácido <i>p</i> -cumárico .....   | 28 |
| 2.6 4-Vinilfenol (4VF): Obtenção e aplicações.....   | 30 |
| <b>3 METODOLOGIA</b> .....   | 36 |
| 3.1 Microrganismos .....   | 36 |
| 3.2 Meios de cultura .....   | 37 |
| 3.3 Obtenção do inóculo.....   | 37 |
| 3.4 Ensaio para avaliação de tolerância das cepas ao ácido <i>p</i> -cumárico e <i>screening</i> .....   | 37 |
| 3.5 Avaliação da bioconversão de ácido <i>p</i> -cumárico a 4-vinilfenol em meio sintético pela cepa bacteriana <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48..... | 38 |
| 3.6 Preparo de amostra e quantificação do ácido <i>p</i> -cumárico e do 4-vinilfenol por cromatografia líquida de alta eficiência .....                      | 39 |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 41 |
| 4.1 Avaliação de tolerância das cepas ao ácido <i>p</i> -cumárico.....   | 41 |
| <b>4.2 Avaliação da bioconversão de ácido <i>p</i>-cumárico a 4-vinilfenol em meio sintético</b> ....  | 44 |
| 4.2.1 <i>Screening</i> das cepas bacterianas .....   | 44 |
| 4.2.2 Biotransformação do ácido <i>p</i> -cumárico a 4-vinilfenol pela cepa bacteriana <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48.....                          | 47 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3 Biotransformação do ácido <i>p</i> -cumárico a 4-vinilfenol pela cepa bacteriana <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48 em meio de cultura ausente de glicose.....  | 51        |
| <b>5 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>APÊNDICE A - Dados de quantificação do ácido <i>p</i>-cumárico (CA) e 4-vinilfenol (4VF) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48 em meio contendo glicose .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>APÊNDICE B - Tabela de valores obtidos na quantificação de AC durante a fermentação de 3 horas da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> em MLM contendo glicose..</b>  | <b>63</b> |
| <b>APÊNDICE C - Tabela de valores obtidos na quantificação de 4VF durante a fermentação de 3 horas da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> em MLM contendo glicose..</b>   | <b>64</b> |
| <b>APÊNDICE D - Dados de quantificação do ácido <i>p</i>-cumárico (CA) e 4-vinilfenol (4VF) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> TG 3.48 em meio ausente de glicose.....</b> | <b>65</b> |
| <b>APÊNDICE E - Tabela de valores obtidos na quantificação de AC durante a fermentação de 3 horas da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> em MLM ausente de glicose.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>APÊNDICE F - Tabela de valores obtidos na quantificação de 4VF durante a fermentação de 3 horas da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> em MLM ausente de glicose.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>APÊNDICE G - Concentrações de ácido <i>p</i>-cumárico (CA) e 4-vinilfenol (4VF) da curva de calibração em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</b>  | <b>68</b> |
| <b>APÊNDICE H - Tabela de valores obtidos na curva de calibração de AC usadas para quantificação nas fermentações de 3 horas da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> em MLM.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>APÊNDICE I - Gráfico da curva de calibração do AC.....</b>  | <b>69</b> |
| <b>APÊNDICE J - Tabela de valores obtidos na curva de calibração de 4FV usadas para quantificação nas fermentações de 3 horas da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> em MLM.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>APÊNDICE K - Gráfico da curva de calibração do 4VF .....</b>  | <b>70</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>APÊNDICE L - Concentrações de glicose da curva de calibração em espectrofotômetro de UV-Vis .....</b>  | <b>70</b> |
| <b>APÊNDICE M - Tabela de valores obtidos na curva de calibração de glicose usados para quantificação na fermentação de 3 horas da cepa <i>Ochrobactrum intermedium</i> em MLM contendo glicose .....</b> | <b>71</b> |
| <b>APÊNDICE N - Gráfico da curva de calibração da glicose.....</b>  | <b>71</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento da indústria agrícola brasileira tem aumentado a geração dos resíduos lignocelulósicos, demandando a estes uma melhor destinação, razão essa que tem incentivado várias pesquisas para o seu aproveitamento. Portanto, são necessários novos processos químicos e biológicos que sejam economicamente viáveis para a conversão da biomassa em produtos químicos de alto valor agregado, como biocombustíveis e outros compostos químicos amplamente utilizados pela indústria de química fina (CGEE, 2010).

O aproveitamento da biomassa lignocelulósica corresponde a separação e conversão dos seus principais constituintes: celulose, hemicelulose e lignina (PÉREZ et al., 2002). Os polissacarídeos têm seus compostos derivados mais intensamente explorados visando sua valorização econômica, como por exemplo, a utilização da celulose e hemicelulose na geração de hexoses e pentoses a serem convertidos em biocombustíveis (KOUTINAS et al., 2014).

Estes monossacarídeos são recuperados da biomassa vegetal mediante um método de pré-tratamento, normalmente químico, responsável pela desconstrução da matriz complexa dos resíduos lignocelulósicos, dissociando os monossacarídeos para fermentação subsequente (CHIO; SAIN; QIN, 2019). Todavia, a lignina obtida no processo, que é uma macromolécula composta de subunidades fenólicas, ainda não é aproveitada de forma equivalente a celulose e hemicelulose.

Os métodos de pré-tratamento químicos disponíveis utilizam soluções aquosas ácidas, alcalinas ou empregam solventes orgânicos sendo que cada método fornece produtos de desconstrução distintos a depender das características da matéria prima e dos produtos finais desejados, com cada método apresentando suas vantagens e desvantagens (WAGLE et al., 2022).

O pré-tratamento ácido utiliza o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), clorídrico (HCl) ou fosfórico ( $H_3PO_4$ ), destacando-se principalmente o uso do ácido sulfúrico. O meio ácido dissolve a hemicelulose e modifica a lignina da matriz lignocelulósica aumentando a exposição da celulose para etapas posteriores de tratamento. Entretanto, embora seja um tipo de tratamento de simples aplicação, é menos utilizado pois requer reatores resistentes a corrosão, exige tratamento dos resíduos altamente acidificados além gerar inibidores que dificultam a utilização de microrganismos para a bioconversão dos produtos obtidos (CGEE, 2010).

Uma alternativa à utilização de ácidos é o pré-tratamento alcalino que utiliza bases como os hidróxidos de sódio (NaOH), potássio (KOH), cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e de amônio (NH<sub>4</sub>OH), sendo o hidróxido de sódio mais frequentemente usado pela indústria. As bases provocam a quebra da ligação éster na cadeia glicosídica entre a hemicelulose e/ou lignina-celulose, resultando na dissociação parcial da lignina, entumescimento da celulose nativa e perda parcial da cristalinidade da celulose e hemicelulose (ARNI, 2018). As vantagens do método de pré-tratamento alcalino são as condições mais amenas da reação, uma menor degradação dos monossacarídeos constituintes e a alta eficiência de remoção da lignina da biomassa vegetal (MUTHUVELU et al., 2019). As desvantagens do método de pré-tratamento alcalino são problemas de corrosão dos reatores, tratamento do resíduo com alta carga de base e dependendo do método, os longos tempos de reação (WAGLE et al., 2022). Como exemplo da utilização da hidrólise alcalina pode-se citar a produção etanol de 2<sup>a</sup> geração (CHIO; SAIN; QIN, 2019) e o processo Kraft amplamente utilizado na produção de papel celulósico (ERAGHI KAZZAZ; FATEHI, 2020). Estes dois processos geram como produtos de reação uma massa amórfica de fibras celulósicas e o licor negro, rico em lignina, hemicelulose e vários outros compostos fenólicos (CARVALHO, 2011).

A lignina é a segunda macromolécula mais abundante da Terra, depois da celulose, presente nas plantas desempenhando funções de sustentação do tronco, impermeabilização do floema e defesa contra ataques mecânicos e microbianos (LINGER et al., 2014). No entanto, essas propriedades biológicas naturais acabam dificultando sua desconstrução nos tratamentos da biomassa vegetal (RAGAUSKAS et al., 2014). Dentre os compostos aromáticos que podem ser obtidos da lignina estão os ácidos cinâmicos, destacando-se os ácidos *p*-cumárico (AC) e ferúlico (AF), presentes principalmente na lignina da parede celular de plantas gramíneas como no trigo, arroz, milho e cana-de-açúcar. Porém, estes compostos não estão livres e sim associados por meio de ligações do tipo éster a lignina e aos polissacarídeos (LOU et al., 2012).

O AC apresenta um efeito antioxidante natural (DAS; GOUD; DAS, 2019 e DE LA ROSA et al., 2018), sendo que nos microrganismos, apresenta potencial bactericida variado. Essa resposta antimicrobiana pode ocorrer em duas vias: a primeira é na ligação com a membrana celular desestabilizando sua estrutura e provocando a lise osmótica; a segunda, tem ação direta sobre o DNA causando várias mutações deletérias. A associação dessas duas vias pode resultar em uma ação bactericida de alta eficiência (LOU et al., 2012).

As cepas bacterianas tolerantes a altas concentrações de AC normalmente possuem vias metabólicas de bioconversão deste composto, o transformando em metabólitos intermediários menos tóxicos ou assimiláveis, dos quais os mais interessantes para indústria são 4-vinilfenol (4VF) (PAZ et al., 2019; DEGRASSI; DE LAURETO; BRUSCHI, 1995), ácido cafeico (LIN; YAN, 2014), ácido *p*-hidroxibenzóico (JYOTHI; JIMCY; MANOHAR, 2018) e ácido protocatecuico (TORRES Y TORRES; ROSAZZA, 2001). O AC, além de ser um reagente em potencial, também é utilizado como aromatizante natural, na produção de alimentos, rações animais, cosméticos, além ser um bloco de construção químico na indústria farmacêutica e tecnológica (PAZ et al., 2019).

O AC e o 4VF estão disponíveis na natureza para extração, mas em quantidades pequenas, e, portanto, economicamente inviáveis considerando o tempo e recursos que seriam demandados. Na indústria, esses compostos têm sido produzidos por processos químicos de síntese, utilizando como reagentes de partida compostos oriundos da indústria petroquímica, que fazem o produto final apresentar custo elevado e ainda parte de uma matéria prima não renovável. Nesse contexto, a biotransformação dos precursores naturais por células e/ou enzimas em um processo de baixo custo e ambientalmente mais amigável mostra-se bastante atrativo (SACHAN et al., 2006).

Em trabalhos prévios do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Ibilce, Unesp, foram estudadas bactérias capazes de tolerar altas concentrações de AF e realizar sua biotransformação à 4-vinilguaiacol por ação da enzima ácido ferúlico descarboxilase. Estes resultados indicaram que algumas dessas linhagens também toleravam e/ou biotransformavam o AC a 4VF (DOS SANTOS et al., 2021). Assim, o presente trabalho propõe o estudo da tolerância e potencial bioconversão do AC em 4VF por cepas utilizando soluções modelo.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Gerais**

Estudar linhagens bacterianas com potencial de tolerância e biotransformação do AC a 4VF.

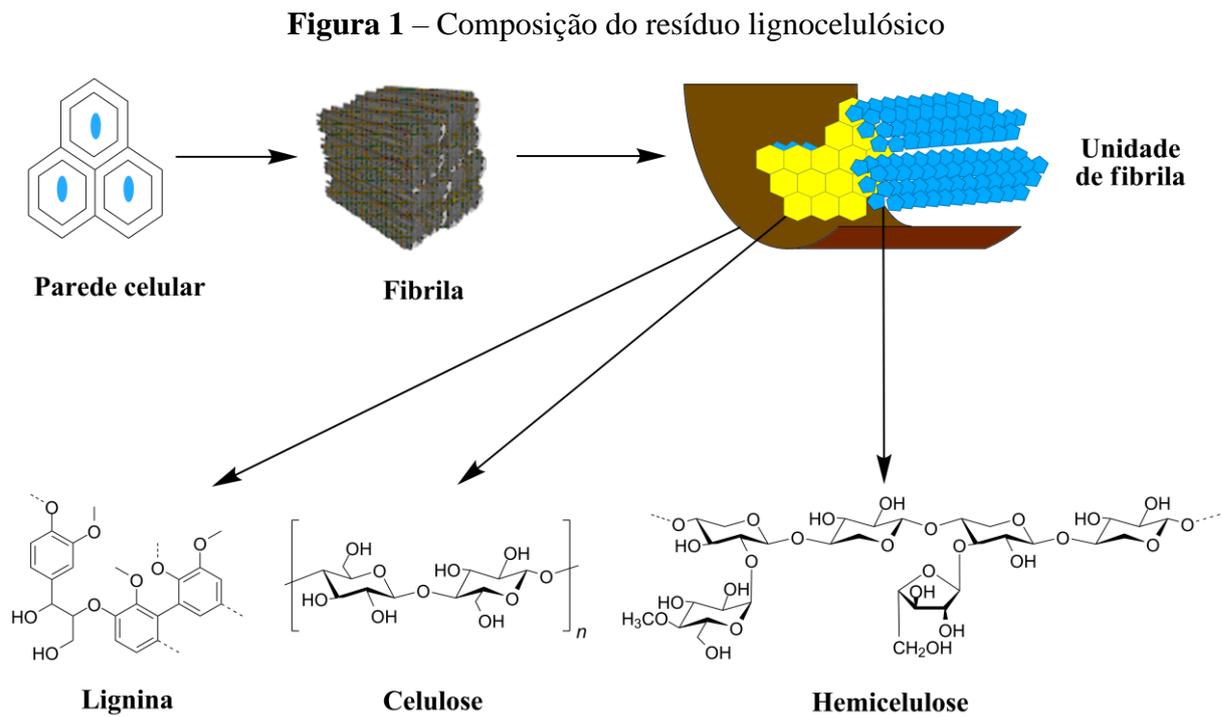
### **1.1.2 Específicos**

- Definir os níveis de tolerância de cepas bacterianas da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, Ibilce/Unesp ao AC;
- Avaliar a biotransformação do AC a 4VF pelas bactérias selecionadas;
- Quantificar o 4VF formado e identificar e quantificar outros metabólitos formados no curso do processo de biotransformação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Produção de resíduos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos são considerados uma das principais classes de compostos renováveis do planeta (TUCK et al., 2012) sendo constituídos por três principais componentes: celulose (40-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-20%), cujas localizações na parede celular e suas estruturas químicas são mostradas na Figura 1. Os três componentes apresentam imenso potencial para biotransformação em novos produtos, tais como biocombustíveis, blocos de construção para a indústria de química fina e na geração de monômeros formadores de plásticos e/ou fibras, sendo, portanto, bastante atrativos do ponto de vista industrial, econômico e sustentável por se tratar de uma fonte renovável (SARSAIYA et al. 2019).

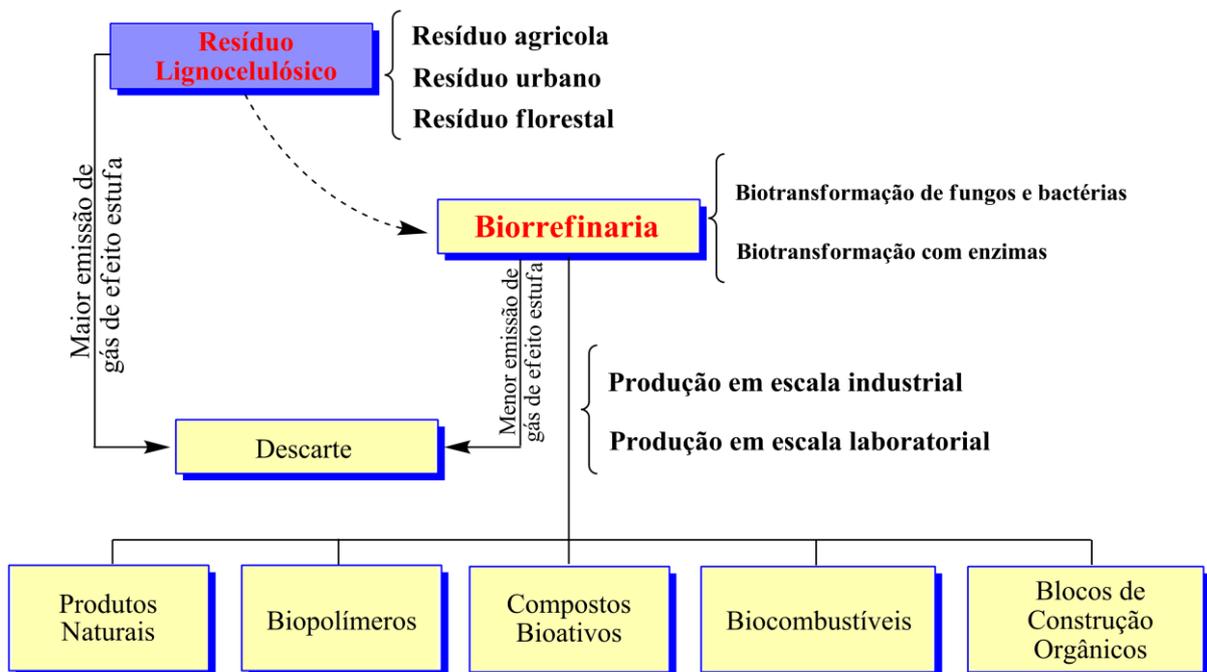


Fonte: Adaptado de KUMAR e CHANDRA, 2020

A partir do potencial de geração contínua e da utilização destes resíduos surgiu o conceito de biorrefinaria, que de forma análoga as refinarias de petróleo modernas, que é capaz de produzir combustíveis e compostos químicos de base, porém utilizando uma fonte renovável de carbono. Além disso, as biorrefinarias também podem gerar energia elétrica pela utilização parcial dos resíduos, tornando-a praticamente autossuficiente (AB RASID et al., 2021).

A biomassa que pode ser utilizada nas biorrefinarias é gerada nas várias etapas do processo produtivo, da colheita aos diferentes tratamentos usados na fabricação de produtos primários (SARSAIYA et al., 2019). A Figura 2 ilustra uma possível rota de transformação de resíduos lignocelulósicos e potenciais produtos que podem ser gerados, bem como suas aplicações.

**Figura 2** – Representação esquemática do bioprocessamento dos resíduos lignocelulósicos



**Fonte:** Adaptado de SARSAIYA et al. 2019

Portanto, o conceito de biorrefinaria integrada de base biológica mostra-se uma alternativa promissora, pois busca o desenvolvimento tecnológico da indústria de forma mais sustentável através de microrganismos e/ou enzimas, diminuindo o impacto ambiental da atividade agrícola e aumentando o lucro do agronegócio na geração de novos produtos

(MENDES et al., 2018). Logo, mais pesquisas mostram-se indispensáveis para atender à demanda crescente de destinação sustentável dos resíduos vegetais.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de celulose Kraft, tendo o agronegócio um papel importante na economia brasileira (CONAB, 2019; FAO, 2019). Estas atividades agroindustriais têm gerado milhões de toneladas de resíduos no país, os quais normalmente são usados na queima para geração de energia elétrica nas instalações industriais. No entanto, parte da biomassa que hoje é queimada poderia ser empregada na produção de compostos químicos de alto valor agregado. Logo, do ponto de vista econômico, um processo tecnicamente simples e de baixo custo pode ser uma importante alternativa dentro dos princípios de biorrefinaria integrada de base biológica.

## **2.2 Lignina e seu potencial na geração de valor agregado**

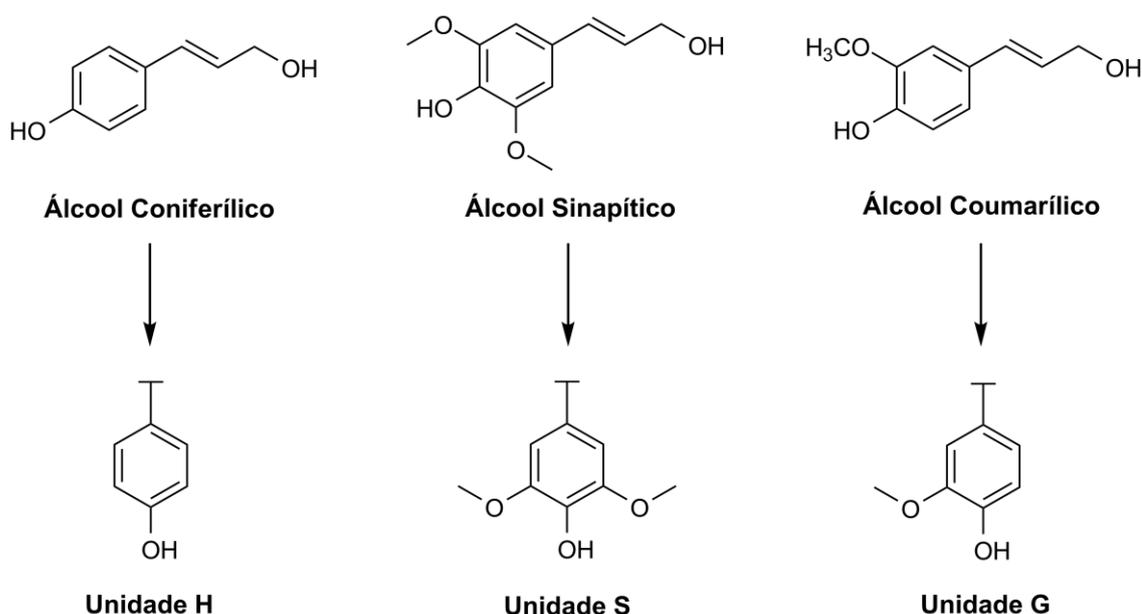
Os componentes lignocelulósicos, celulose, hemicelulose e lignina, correspondem a metade da matéria produzida pelas plantas na fotossíntese, além de apresentarem na sua composição compostos orgânicos não estruturais como compostos fenólicos, carboidratos, lipídios e proteínas (PÉREZ et al., 2002).

Dos blocos essenciais destaca-se a celulose como o polissacarídeo mais importante, compondo até 50% em massa da biomassa vegetal, com alta massa molar, sendo formada por cadeias de D-glicose unidas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, formando fibras compactas unidas por ligações de hidrogênio e por forças de Van der Waals. A celulose possui regiões altamente organizadas (cristalinas) e outras menos organizadas (amorfas). Essas fibras são emaranhadas a polímeros de hemicelulose e a macromoléculas de lignina (PÉREZ et al., 2002).

A biomassa vegetal também é composta de hemicelulose (25-30% em massa) diferindo-se da celulose pela composição heterogênea de pentoses e hexoses além de uma menor massa molar. Os monômeros formadores da hemicelulose são D-arabinose, D-xilose, D-galactose, D-manose e D-glicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas na maioria das vezes e por vezes a ácidos urônicos (4-O-metil-glucurônico, D-galacturônico e D-glucurônico). Os componentes estruturais variam de acordo com a espécie e idade da planta, sendo que as cadeias de polissacarídeos podem formar arranjos lineares ou ramificados (KUMAR; CHANDRA, 2020).

A lignina, entretanto, é uma macromolécula composta por subunidades fenólicas derivadas dos álcoois coniferílico, sinapílico e cumarílico, formando as unidades *p*-hidroxifenila, siringila e guaiacil respectivamente (H, S e G), conforme ilustrado na Figura 3. Estas subunidades são unidas por diferentes ligações químicas, cujas proporções variam de acordo com a fonte de obtenção da lignina.

**Figura 3** – Estruturas químicas dos precursores que constituem a lignina



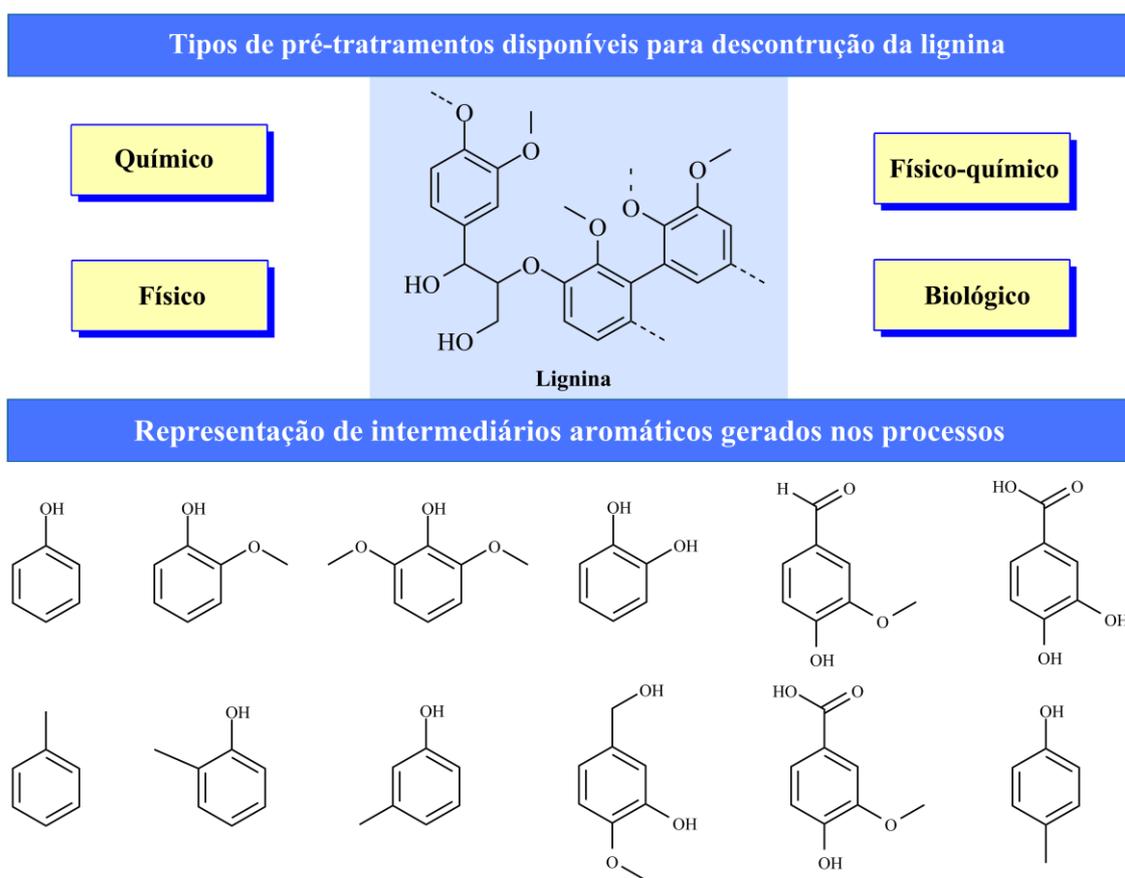
**Fonte:** Adaptado de CHIO; SAIN; QIN, 2019

Nas plantas, a lignina é importante pois oferece resistência contra danos mecânicos, ajudando na sustentação, conferindo proteção contra invasões de patógenos e no transporte de água, por meio da impermeabilização dos vasos condutores, sendo uma macromolécula fundamental na manutenção das atividades vitais (GRABBER, 2005).

A lignina é relativamente insolúvel em soluções aquosas ácidas ou básicas e apresenta alta recalcitrância em razão dos compostos aromáticos que a formam, resultando na dificuldade de sua desconstrução pelos métodos convencionais de pré-tratamento da biomassa vegetal (LINGER et al., 2014). A recalcitrância natural da lignina é derivada principalmente pelas ligações C-C e C-O (aril-éter) altamente estáveis do ponto de vista termodinâmico (RAGAUSKAS et al., 2014).

Portanto, a etapa de pré-tratamento é fundamental na desconstrução da parede vegetal em seus componentes, aumentando a exposição da estrutura as etapas posteriores, de modo que não ocorra a degradação dos açúcares ou a formação de inibidores indesejáveis (AB RASID et al., 2021). A Figura 4 ilustra de forma simplificada o processo de desconstrução da lignina e os possíveis compostos fenólicos gerados por este processo.

**Figura 4** – Fragmentação da lignina em derivados de baixa massa molecular



**Fonte:** Adaptado de RAGAUSKAS et al. 2014

Em última análise, muito dos principais compostos químicos comerciais são compostos fenólicos derivados normalmente da indústria petroquímica. Contudo, a lignina é a única fonte renovável em grande escala para obtenção de compostos fenólicos (TUCK et al., 2012). Atualmente o único processo de valorização rentável de derivados da lignina é a produção de vanilina pela transformação da lignina sulfonada, um subproduto da produção de papel celulósico empregando o processo sulfito (TUCK et al., 2012). No entanto, foi estimado que a

utilização efetiva da lignina e hemicelulose na geração de coprodutos de alto valor agregado pode aumentar em cerca de 6,2 vezes a receita das indústrias (ZHANG et al., 2008).

No Brasil, duas indústrias se destacam na produção de grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos: a sucroalcooleira e a de papel e celulose. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) Os dados relativos à safra 2021/2022 apontam para uma produção de 568 milhões de toneladas de cana-de-açúcar o que leva a produção de aproximadamente 170 milhões de toneladas de bagaço. Além disso, são geradas quantidades consideráveis de palha e pontas que também são materiais ricos em compostos lignocelulósicos. A indústria de papel e celulose produziu cerca de 21 milhões de toneladas de celulose em 2021, gerando cerca de 52 milhões de toneladas de resíduos. Atualmente esses resíduos são queimados para a geração de energia para a alimentação das instalações e em alguns casos o excedente é vendido para o sistema elétrico nacional (CONAB, 2019; FAO, 2019).

Contudo, a biotransformação dos componentes da matriz vegetal complexa em produtos de valor elevado de grande e pequena escala produtiva, como biocombustíveis e insumos químicos, representa uma alternativa promissora no aproveitamento do resíduo lignocelulósico, além de fazer uma produção mais ecologicamente amigável em comparação ao processo de queima convencional (KUMAR; CHANDRA, 2020). A produção de produtos aromáticos como o estireno poderia ser feita a partir da lignina, contudo apesar das extensas pesquisas, ainda não existem formas eficientes de obtenção dos mesmos (CHIO; SAIN; QIN, 2019).

A Suzano<sup>TM</sup> empresa brasileira de produção de polpa celulósica considerada a maior produtora de celulose derivada do Eucalipto do mundo criou a Ecolig, uma frente de inovação especializada na valorização da lignina, proveniente do excedente não convertido em energia elétrica. A empresa tem buscado utilizar a macromolécula como matriz na geração de vários produtos ecologicamente sustentáveis, contudo, esses produtos ainda estão em fase de desenvolvimento (ECOLIG, 2022).

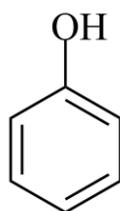
Apesar da biorrefinaria ser um conceito relativamente novo, em sentido estrito, as práticas produtivas devem buscar de forma majoritária o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, contudo, embora já seja praticada em alguns setores da indústria no Brasil, como a indústria sucroalcooleira e a indústria de papel/celulose anteriormente discutidos. No entanto, apesar de haver um aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos por esses setores, a indústria de forma geral tem agregado pouco valor nas frações que o compõe, isso geralmente

ocorre e pela falta de processos produtivos economicamente viáveis, falta de conhecimento e de oportunidade pelas empresas (CGEE, 2010).

### 2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe de moléculas que tem um ou mais grupos hidroxilas (OH) ligados diretamente a um anel benzênico. O fenol (Figura 5) é o composto mais importante da classe (W. VERMERRIS, 2009).

**Figura 5** – Estrutura química do fenol



**Fonte:** Autoria própria

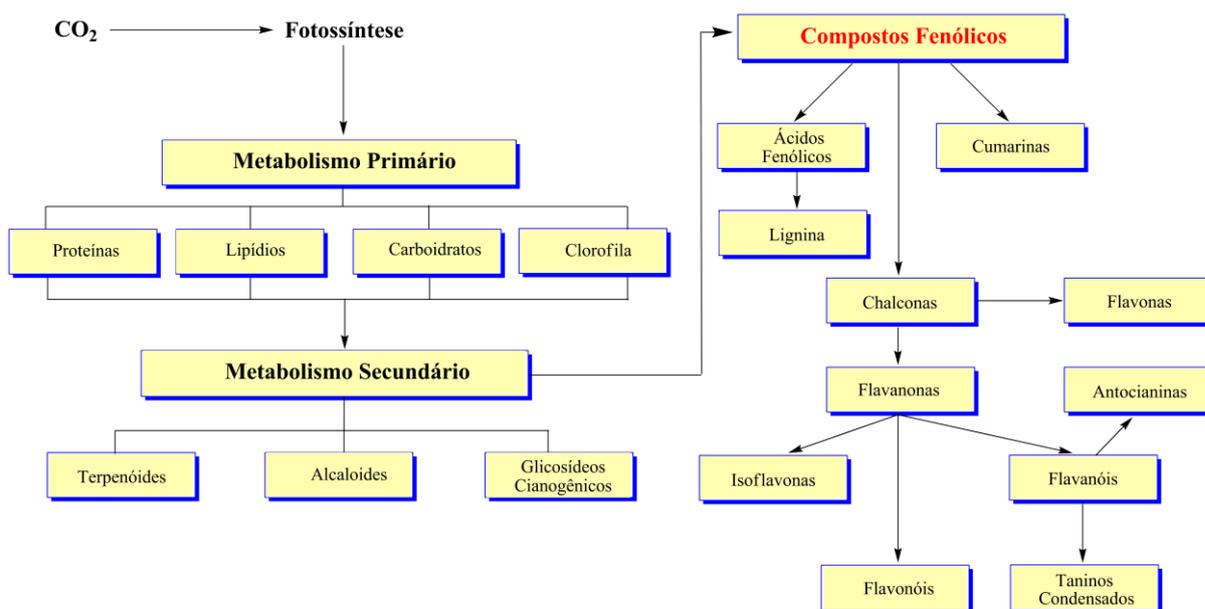
O termo é bastante amplo incluindo um grande número de compostos químicos naturais, dos quais cerca de 8000 foram isolados e classificados de acordo com suas propriedades químicas ou ocorrência natural (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2018).

Nas plantas os compostos fenólicos desempenham várias funções como a defesa contra patógenos e herbívora, absorção de luz, atração de polinizadores, redução do crescimento e promoção de relações simbióticas, como por exemplo as bactérias fixadoras de nitrogênio (DAS; GOUD; DAS, 2019).

Os compostos fenólicos estão distribuídos de forma variada na maioria dos tecidos vegetais, incluindo nos frutos, onde desempenham a função de antioxidantes naturais em resposta ao estresse biótico e abiótico, sendo encontrados em maiores proporções principalmente em culturas orgânicas que estão mais sujeitas às variações ambientais (CLIFFORD, 1999).

O metabolismo das plantas pode ser simplificado em primário, envolvido na formação dos compostos essenciais encontrados em todas as células, caracterizados pelas vias estruturais e de produção ou armazenamento de energia, esse metabolismo é fundamental para manutenção da vida celular conforme ilustra parte da Figura 6. Já o metabolismo secundário está envolvido com a formação dos compostos não vitais para célula, porém não menos importantes, por serem compostos que auxiliam na adaptação dos organismos e sobrevivência em condições variadas (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2018). A formação desses compostos pela planta está associada ao seu metabolismo secundário (Figura 6), por meio da via do fenilpropanol, sintetizados na forma de dois grupos químicos os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos na presença dos seus precursores, o ácido benzoico e cinâmico respectivamente.

**Figura 6** – Metabolismo primário e secundário das plantas



**Fonte:** adaptado de VUOLO; LIMA; MORÓSTICA JUNIOR, 2018

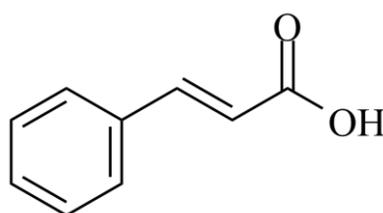
Os metabólitos secundários apresentam uma ampla gama de funções nas plantas e têm uma variabilidade química maior em relação aos metabólicos primários, desempenhando papéis relacionados ao desenvolvimento, defesa e crescimento. Geralmente, os compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundários não estão livres nas células, estando quimicamente associados a outros compostos, normalmente ligados a ésteres ou glicosídeos (W. VERMERRIS, 2009).

Os estudos recentes sobre as propriedades químicas dos compostos fenólicos têm de forma geral focado principalmente no papel destes como antioxidantes naturais. Por apresentarem alto potencial redutor, atuam como agentes doadores de elétron e/ou de átomo de hidrogênio reduzindo a presença dos radicais nas células (principalmente hidroxila e superóxido), moléculas relacionadas ao estresse oxidativo originadas da respiração celular (DE LA ROSA et al., 2018). Além disso, os compostos fenólicos também atuam ligando-se a íons de metais de transição, principalmente de ferro e cobre, diminuindo a formação desses radicais (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

## 2.4 Ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos/hidroxicinâmicos são um grupo de moléculas que tem sua estrutura química formada por um esqueleto contendo um anel benzênico (C6) e uma unidade fenilpropanoíde (C3), possuindo ampla distribuição no Reino Vegetal. As estruturas mais encontradas nas plantas são o ácido cinâmico (Figura 7), AC, AF, ácido cafeico e sinápico.

**Figura 7** – Estrutura química do ácido cinâmico



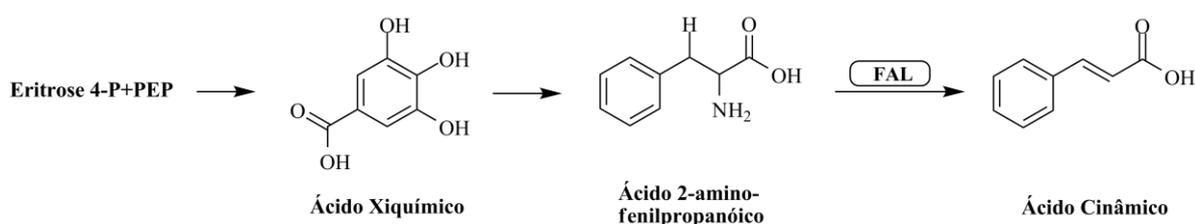
**Fonte:** Autoria própria

Os derivados do ácido cinâmico são encontrados na forma de ésteres ao ácido quínico, tártaro e outros ácidos orgânicos ou a carboidratos (W. VERMERRIS, 2009). Os ácidos cinâmicos raramente aparecem na forma livre, estando geralmente associados à parede celular das plantas, encontrados nas flores e frutos como ácidos orgânicos esterificados. Frutos como maçãs, cerejas, pêssegos, ameixas, várias frutas vermelhas e algumas frutas cítricas são ricas em compostos fenólicos totais, tendo o AC e ácido cafeico representando entre 75 a 100% do conteúdo de compostos fenólicos totais dos frutos (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR,

2018). No entanto, também são encontrados na forma livre em alimentos processados e nas bebidas fermentadas (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2018).

Os ácidos cinâmicos são produzidos na rota metabólica de síntese da lignina, na via fenilpropanoide (Figura 8), responsável pela formação de vários outros compostos polifenólicos como flavonóides, isoflavonóides, cumarinas e taninos. A enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) catalisa a primeira etapa da via fenilpropanoide, ligando-se a L-fenilalanina e removendo o grupo amino da molécula para produzir ácido cinâmico, que é posteriormente biotransformado por outras enzimas gerando com isso uma série de compostos derivados (DE LA ROSA et al., 2018).

**Figura 8** – Síntese de ácido cinâmico na via fenilpropanoide catalisada pela enzima PAL



**Fonte:** Adaptado de DAS; GOUD; DAS, 2019

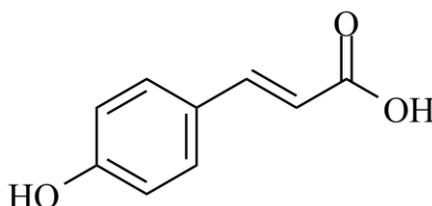
Os ácidos cinâmicos, de forma geral, possuem atividade antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e antifúngica, sendo, portanto, moléculas atrativas a muitos setores produtivos da indústria (DAS; GOUD; DAS, 2019). Contudo, a maioria dos estudos sobre os ácidos cinâmicos estão em fase preliminar, demandando pesquisas adicionais que esclareçam os mecanismos empregados e comprovem seus efeitos benéficos a saúde humana (DAS; GOUD; DAS, 2019).

Outro potencial de aplicação dos ácidos cinâmicos são como precursores de compostos químicos, geralmente aromatizantes da indústria alimentícia, sendo exemplos o 4VF, o 4-vinilguiacol e vanilina (RAGAUSKAS et al., 2014). Estes compostos são obtidos atualmente através de rotas sintéticas com precursores químicos oriundos do petróleo. No entanto, estes podem ser obtidos através de rotas biológicas, utilizando-se microrganismos e/ou enzimas o que demanda mais estudos de modelos produtivos economicamente viáveis, agregados aos conceitos de produção sustentável e biorrefinaria (CGEE, 2010).

## 2.5 Ácido *p*-cumárico

O AC (Figura 9) é uma molécula do grupo dos ácidos cinâmicos, sendo formada por um esqueleto contendo um fenol (C6) e uma unidade fenilpropanoide (C3), com uma função ácido carboxílico no carbono terminal.

**Figura 9** – Estrutura química do ácido *p*-cumárico (AC)



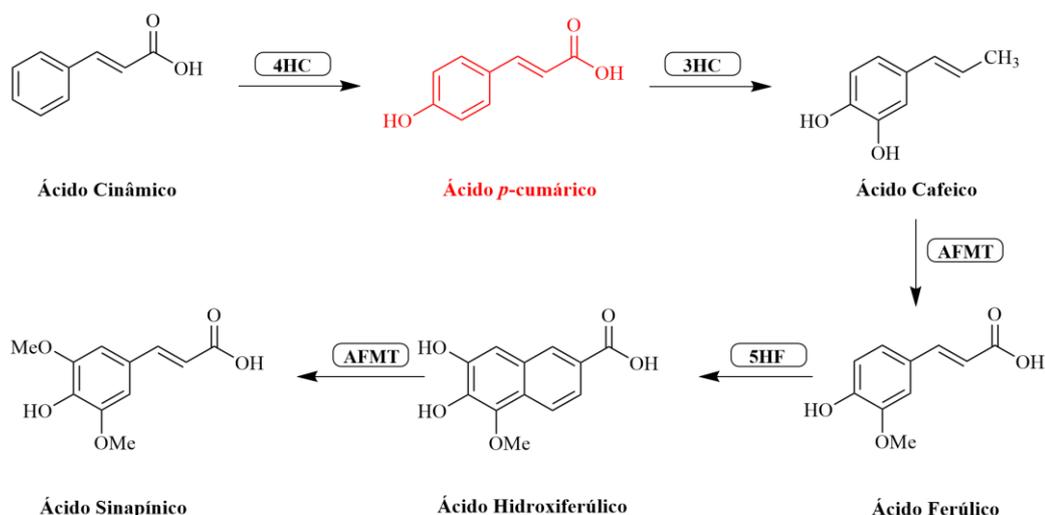
**Fonte:** Autoria própria

As principais fontes de AC são frutas vermelhas tais como as cerejas, uvas e morango (MATTILA; PIHLAVA; HELLSTRÖM, 2005). ou em alimentos processados e bebidas fermentadas como na cerveja, vinho ou vinagre de vinho em baixas concentrações (DE LA ROSA et al., 2018).

De forma análoga aos compostos fenólicos e aos ácidos cinâmicos, o AC raramente encontrados de forma livre, sendo encontrados em maiores proporções nas plantas gramíneas, principalmente nas espécies de clima quente como a cana-de-açúcar e o milho (AKIN, 1982 e 2008). O AC está presente nas estruturas reprodutivas e também é encontrado associado a parede celular (SACHAN et al., 2006).

O AC é formado no metabolismo secundário das plantas na via geral do fenilpropanoide (Figura 10) iniciando-se com a biotransformação do L-fenilalanina a ácido cinâmico catalisada pela enzima FAL. Subsequentemente, o ácido cinâmico é hidroxilado mediante a catalise da enzima 4-hidroxilase do ácido cinâmico (4HC), resultando na formação de AC (WITHERS et al., 2012). Reações enzimáticas subsequentes levam a transformação dele em outros compostos derivados.

**Figura 10** – Síntese de ácido *p*-cumárico na via fenilpropanoide catalisada pela enzima 4HC



**Fonte:** adaptado de DAS; GOUD; DAS, 2019. (3HC) 3-hidroxilase do cumarílico, (AFMT) ácido cafeico orto-metiltransferase, (5HF) 5-hidroxilase do ferúlico.

O AC é convertido em AF por reação de hidroxilação e metilação, seguida da reação de hidroxilação e metilação em outros compostos aromáticos, gerando derivados di- e tri-hidroxi do AC, compostos que participam da formação da macromolécula de lignina (KUMAR; PRUTHI, 2014).

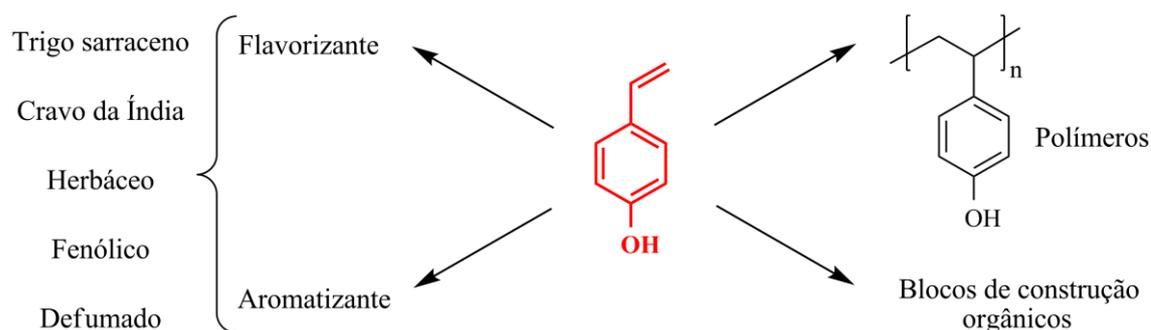
Várias pesquisas têm mostrado que o AC possui propriedades quimioprotetoras e antioxidantes (TORRES Y TORRES; ROSAZZA, 2001). Porém, nas bactérias, em determinadas concentrações pode apresentar efeito bactericida conjugado desestabilizando a membrana plasmática, interferindo na permeabilidade seletiva causando a morte por lise osmótica e ligando-se diretamente ao ânion fosfato na dupla hélice de DNA provocando mutações que comprometem a replicação, transcrição e expressão normal da célula procariótica (LOU et al., 2012), assim culminando em uma dupla via bactericida. Contudo no trabalho de revisão de GUZMAN (2014), a respeito da concentração inibitória mínima (CIM) de vários ácidos cinâmicos e moléculas relacionadas frente a microrganismos, constatou-se que o poder antibiótico do AC varia muito de espécie para espécie. Comparando algumas cepas bacterianas Gram-negativas GUZMAN (2014) mostrou que os valores de CIM encontrados variaram entre 10 a 2198 mg L<sup>-1</sup>, dificultando o estabelecimento de um parâmetro comum entre os grupos afetados.

Na indústria o AC apresenta grande valor comercial na sua forma natural ou biotransformado em seus derivados. No entanto, o AC e seus derivados são obtidos quase que exclusivamente por rotas sintéticas empregando compostos precursores oriundos do petróleo (PAZ et al., 2019). Porém algumas bactérias possuem vias metabólicas alternativas capazes de metabolizar o AC, sob condições limitantes, no processo de bioconversão o transformando em metabolitos intermediários de interesse comercial (RODRIGUEZ et al., 2021). A produção biológica desses metabolitos tem intuito de substituir a síntese química por processos naturais desde que sejam economicamente viáveis, ou seja, capazes de atender ao mercado crescente que demanda o uso dessas moléculas criando de processo de biorrefinaria rápido e de rendimento elevado, acompanhado do baixo custo e condições amenas de reação. (PAZ et al., 2019). Logo, a síntese biológica por células e/ou enzimas utilizando o AC para a geração produtos de valor agregado tem como objetivos reduzir os danos ambientais decorrentes da produção petroquímica, além de conferir uma destinação mais adequada da lignina oriunda dos resíduos lignocelulósicos, de forma que possa atender a demanda crescente de mercado por produtos ecologicamente amigáveis.

#### **2.6 4-Vinilfenol (4VF): Obtenção e aplicações**

O 4VF é um composto aromático que possui um grupo estireno ligado a um anel fenólico. Existe uma demanda mundial de 4VF e seus derivados, principalmente para a indústria de polímeros (polivinilfenol e polímeros derivados). Os polímeros derivados podem ser utilizados em revestimentos antimicrobianos, adesivos resistentes a água, elastômeros, baterias de lítio, películas fotoresistentes e em materiais dielétricos como transistores orgânicos, indústria de aromatizantes e flavorizantes. O 4VF e seus derivados podem ter aplicação como blocos de construção em síntese orgânica, por apresentarem uma olefina e um álcool que podem ser quimicamente modificados através de um grande número de reações orgânicas. A Figura 11, abaixo, ilustra as principais aplicações do 4VF.

**Figura 11** – Aplicações comerciais de 4VF e seus derivados em vários setores da indústria

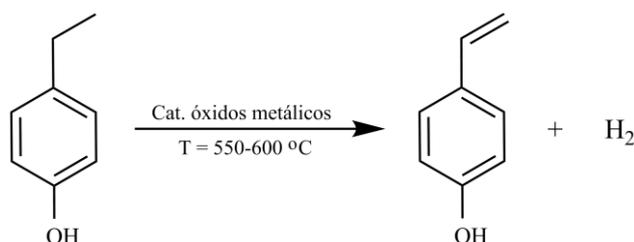


Fonte: Autoria própria

O interesse pelo 4VF e seus derivados na indústria alimentícia também é bastante extenso. Os fenóis voláteis como 4VF são encontrados em bebidas alcoólicas fermentadas como nas cervejas e vinhos, porém em baixas concentrações. Estudos mostraram em testes sensoriais que a concentração ideal destes compostos no vinho é de  $2 \text{ g L}^{-1}$  (CAVIN; BARTHELMEBS; DIVIÈS, 1997), para promoção da melhora das propriedades organolépticas, contudo, concentrações superiores a  $4 \text{ g L}^{-1}$  mudam negativamente a percepção, deixando o vinho com aroma semelhante à de produtos defumados.

Atualmente, a síntese em escala industrial do 4VF se dá através da desidrogenação do 4-etilfenol (Figura 12) em fase gasosa, catalisada por óxidos metálicos (contendo ferro, alumínio e cromo) entre  $550\text{-}600^\circ\text{C}$ . No entanto, este procedimento apresenta rendimento baixo (entre 30 a 40 %), sendo necessário processos posteriores para o isolamento do produto e recuperação do 4-etil-fenol que não reagiu. Além disso, as condições de reação são drásticas (altas temperatura e pressão).

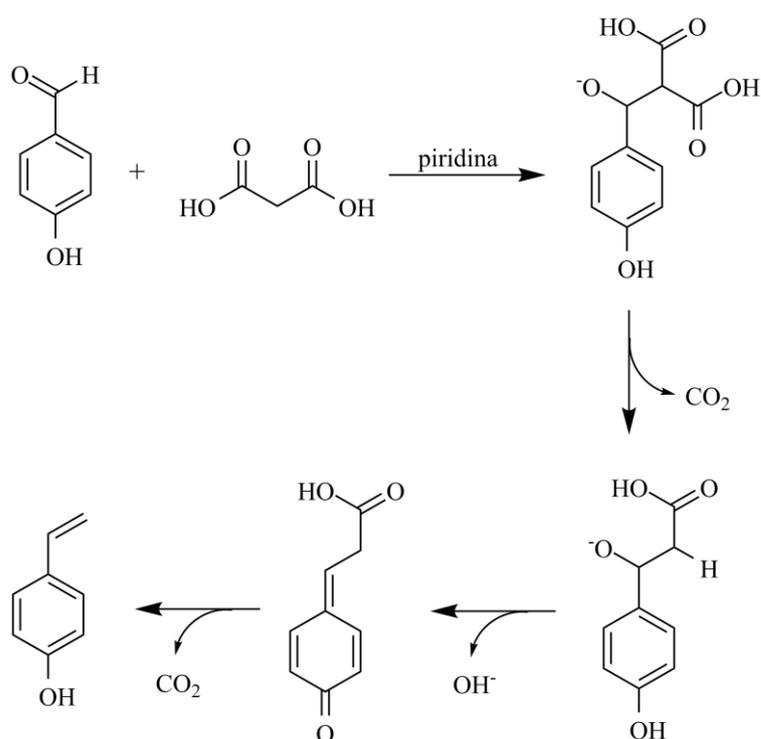
**Figura 12** – Desidrogenação catalítica do 4-etilfenol à 4VF



Fonte: Autoria própria

Outras metodologias também foram propostas para a síntese química do 4VF e seus derivados, utilizando condições de reações mais brandas, através da reação de Knoevenagel-Doeber. Este procedimento parte do 4-hidroxibenzaldeído (ou seus derivados substituídos) e do ácido malônico para a obtenção do 4VF (ou seus análogos substituídos). Esta metodologia tem a vantagem operar em condições de reação amenas e não necessitar de agentes descarboxilantes como a quinilina ou sais de metais de transição presentes em outras metodologias. A Figura 13 ilustra a síntese do 4VF pela rota descrita acima.

**Figura 13** – Condensação Knoevenagel-Doeber de benzaldeídos na geração de 4VF



Fonte: Autoria própria

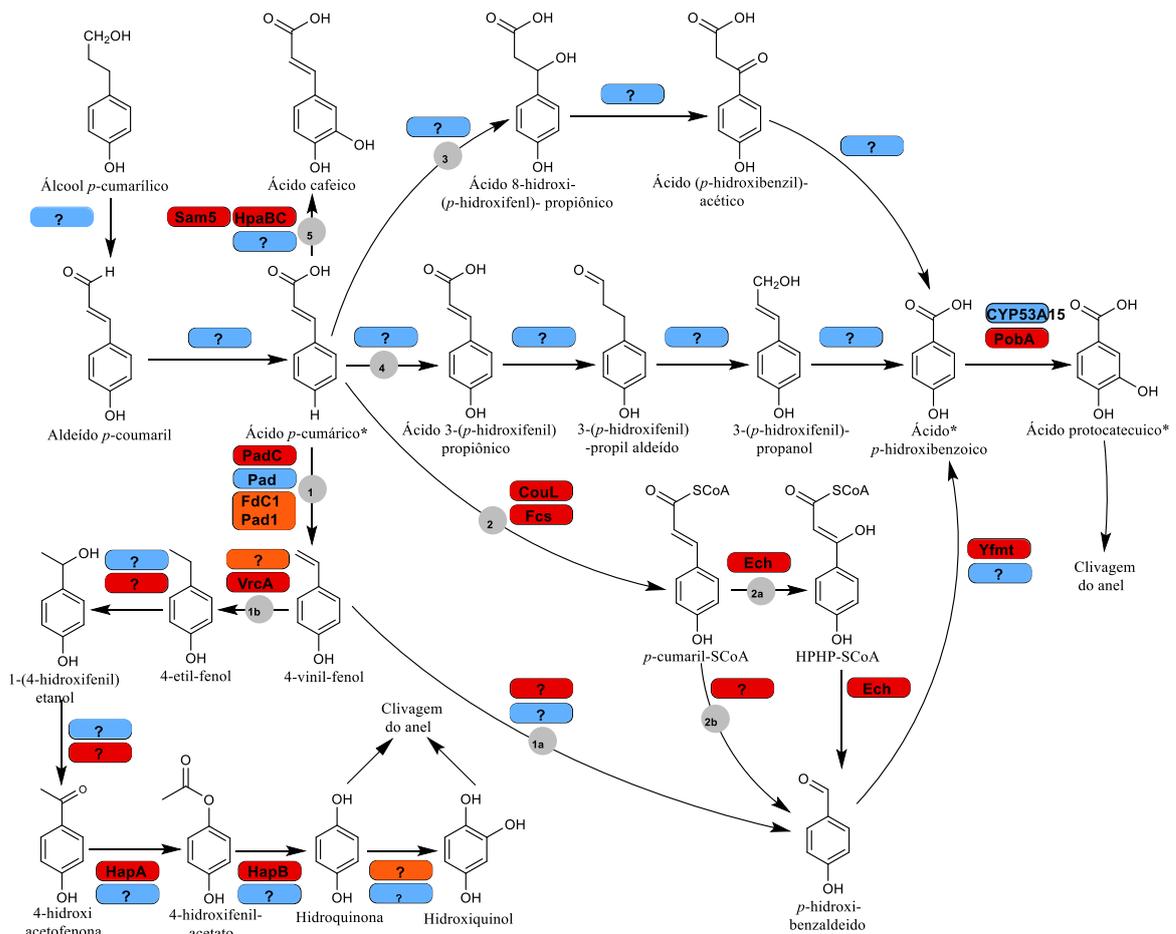
Uma alternativa a síntese química do 4VF é sua obtenção por rotas biológicas, empregando pelos microrganismos (fungos ou bactérias), sendo o principal candidato a reagente de partida o AC

Contudo, os ácidos cinâmicos incluindo AC são extensamente conhecidos por apresentarem um potencial inibitório relativo no crescimento dos microrganismos, atuando como antimicrobiano e antifúngicos naturais sob concentração variadas (FRAS et al., 2014).

Assim, os microrganismos são propensos a expressarem rotas metabólicas de biotransformação do AC em outros metabólitos, menos tóxicos ou não tóxicos, permitindo com isso sua sobrevivência (KUMAR; CHANDRA, 2020).

Normalmente, as rotas metabólicas culminam na clivagem do anel aromático, levando a geração de compostos derivados que são prontamente disponíveis a célula, sob condições de cultivo limitantes (LUBBERS et al., 2019). Existem cinco vias principais da biotransformação do AC descritas na literatura (Figura 14), presentes em bactérias e fungos, cujos os produtos de maior interesse comercial são o 4VF, (PAZ et al. 2019; DEGRASSI et al.1995), ácido cafeico, ácido *p*-hidroxibenzoico e ácido protocatecuico (TORRES; TORRES; ROSAZZA, 2001).

**Figura 14** – Vias de biotransformação do AC em bactérias e fungos para outros compostos aromáticos derivados

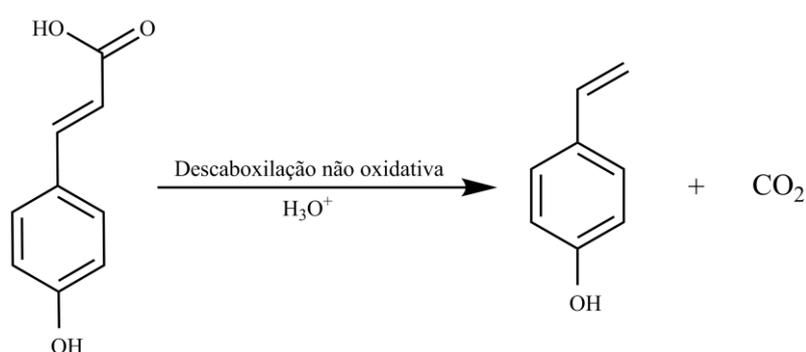


**Fonte:** adaptado de LUBBERS et al. 2019. As enzimas relacionadas as vias estão dispostas próximas as rotas, a cor (vermelha) indica que são encontradas em bactérias, (azul) fungos filamentosos e (laranja) a leveduras, as com ponto de interrogação significa que a enzima não foi identificada e as rotas com asterisco estão associadas a degradação da lignina.

Muitas das vias de bioconversão do AC relatadas vão em direção ao ácido *p*-hidroxibenzóico, descritas em bactérias e fungos filamentosos, apesar de nenhuma enzima ainda ter sido caracterizada em fungos filamentosos. Contudo, considerando todas as vias metabólicas relatadas, considera-se que a descarboxilação não oxidativa do AC seja a principal via metabólica de degradação deste pelos microrganismos (LUBBERS et al., 2019).

As vias de biotransformação relatadas do AC à 4VF em bactérias utilizam as enzimas ácido fenólico (PAD), ácido ferúlico (Fdc1) e ácido *p*-cumárico (*Pdc1*) descarboxilases como catalizadores capazes de descarboxilar de forma não oxidativa o grupo ácido carboxílico do AC (Figura 15) (LUBBERS et al., 2019).

**Figura 15** – Atividade catalítica da enzima descarboxilase



**Fonte:** Autoria própria

Apesar de apresentar uma sequência de reações similar a das bactérias, as descarboxilases dos fungos apresentam baixa atividade catalítica e podem depender de cofatores. Com isso as bactérias são frequentemente mais estudadas para bioconversão de AC em vários compostos de interesse industrial (JUNG et al., 2013).

As bactérias têm uma ampla gama de possibilidades de aplicação industrial na biodegradação da lignina, devido sua natureza mais versátil do ponto de vista de nutrientes necessários a sua sobrevivência e das adaptações ambientais, sendo também mais tolerantes as variações de fatores abióticos se comparadas os fungos, além dos recentes relatos da capacidade de produção de enzimas ligninolíticas extremófilas (KUMAR; CHANDRA, 2020).

Visando biotransformar o AC em 4VF, DEGRASSI; DE LAURETO; BRUSCHI (1995) isolaram a cepa de *Bacillus pumilus* PS213 a partir do líquido ruminal bovino. As enzimas Fdc1

e Pdc1, relatadas como as responsáveis pelas reações de biotransformação, foram purificadas e utilizadas obtendo-se 3,3% de conversão de AC a 4VF comparando-se a atividade apresentada pela enzima em relação ao extrato celular bruto.

JUNG et al. (2013) identificou 8 PAD's com atividade enzimática para conversão de AC em 4VF e as introduziu na cepa de *Escherichia coli* recombinante para avaliação da biotransformação sob concentrações de 16-82 g L<sup>-1</sup>, em meio sintético, em um sistema de reator monofásico aquoso com a biomassa celular imobilizada, obtendo-se 22% de rendimento. O baixo rendimento foi correlacionado com o potencial inibitório do AC e, portanto, um reator bifásico aquoso-orgânico de leite recheado, tendo 1-octanol como fase orgânica e tampão de fosfato como fase aquosa, aumentando o rendimento a 88,7% em 12 horas de fermentação.

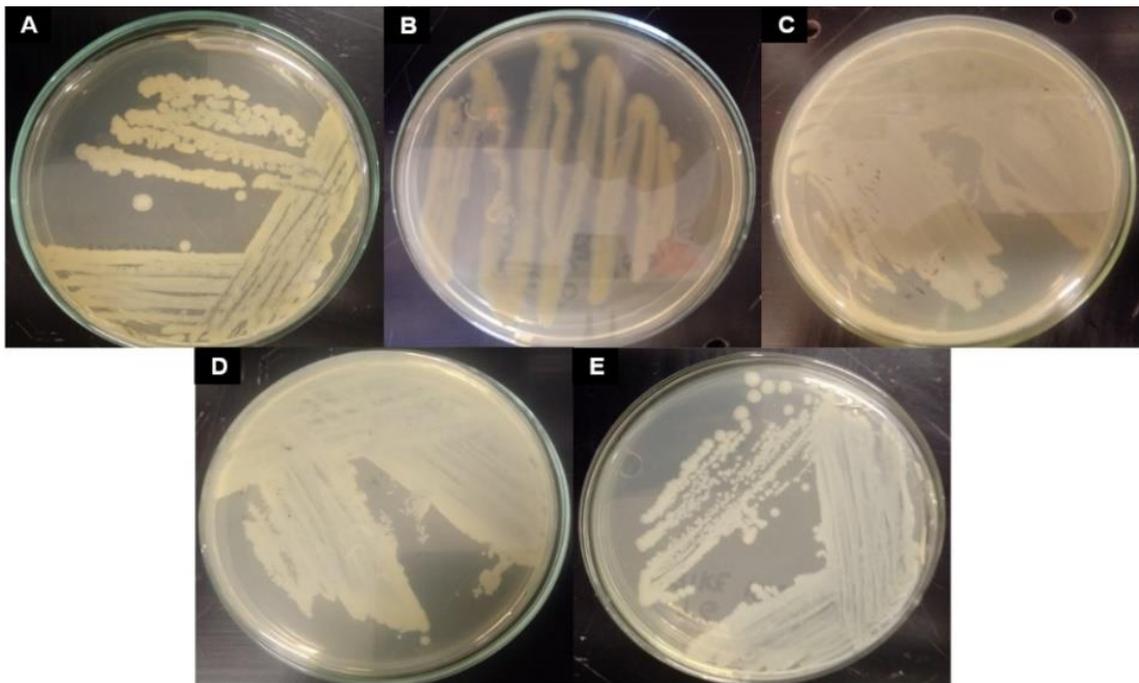
Embora exista alguns modelos efetivos de biotransformação de AC a 4VF de escala laboratorial, falta a integração de um método de extração do precursor natural de forma rápida e barata que possa ser acoplado ao processo é fundamental para viabilidade da produção biológica de 4VF em escalas industrial (SALGADO et al., 2014). Fica claro, portanto, que a biotransformação do AC a 4VF apresenta um viés econômico promissor. Porém são necessários estudos complementares na prospecção de microrganismos tolerantes capazes de realizar à bioconversão com alto rendimento relativo e modelos produtivos economicamente aplicáveis, associado ao conceito de economia sustentável e de biorrefinaria.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Microrganismos

As bactérias previamente isoladas foram 2 cepas identificadas e 3 isoladas (Figura 16) de outros estudos agora pertencentes a coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Ibilce, Unesp. As cepas são a *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7 e os 3 isolados selecionados, entretanto ainda não identificados: TD 2.18.1, TD 2.18.2 e TG 4.48.2, recuperados do freezer a -80 °C estocadas em glicerol 15%.

**Figura 16** – Colônias das cepas (A) *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, (B) *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7, (C) TD 2.18.1, (D) TD 2.18.2 e (E) TG 4.48.2



Fonte: Autoria própria

### 3.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram dois, o meio líquido nutritivo (MLN) (BERTANI, 1951) composto de glicose a 0,2%, cloreto de sódio a 0,1%, triptona a 1,0% e extrato de levedura a 0,5% e meio mineral adaptado (MLM) (BUSHNELL; HAAS, 1941) composto de sulfato de amônio a 1,1%, sulfato de magnésio a 0,02%, cloreto de cálcio a 0,002%, fosfato de potássio monobásico a 0,1%, fosfato de potássio dibásico anidro a 0,1%, acrescido de sulfato de manganês a 0,0003%, sulfato de zinco a 0,0003% e cloreto de cobalto a 0,0001% (massa:volume). As concentrações descritas do MLM foram obtidas mediante preparo de uma solução concentrada e posterior diluição em 10 vezes durante o processo de produção dos meios de ensaio.

Os meios sólidos utilizados no plaqueamento das cepas foram compostos de MLN com a adição de ágar 1,5% para polimerização (massa:volume).

### 3.3 Obtenção do inóculo

O pré-inóculo consistiu de MLN conforme descrito no subitem 3.2 adicionando a suspensão de células bacterianas da coleção indicadas no subitem 3.1, incubadas a 28,0 °C sob agitação de 150 rpm, iniciado em pH 6,0, cultivados por 12 horas. A quantidade de biomassa utilizada nos ensaios foi determinada pela densidade ótica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) analisada em espectrofotômetro, calculando o resultado observado para iniciar a fermentação com a biomassa inicial de  $\cong 0,05 DO_{600nm}$ .

### 3.4 Ensaio para avaliação de tolerância das cepas ao ácido p-cumárico e *screening*

O pré inoculo foi realizado conforme descrito no subitem 3.3. O ensaio de avaliação da tolerância foi feito em placas 96 poços contendo 198  $\mu$ L de MLN acrescido de 2  $\mu$ L de pré-inóculo em MLN. As concentrações de AC testadas foram de 100, 300, 500, 700, 900  $mg L^{-1}$  em pH 6,0 realizadas em quintuplicata. Em conjunto com controles abióticos (CA), contendo MLN não inoculado e controles bióticos (CB), sendo MLN inoculado na ausência de AC.

O cultivo ocorreu a 28,0 °C e agitação de 150 rpm em incubadora orbital. O acompanhamento do crescimento bacteriano ocorreu por meio da leitura da  $DO_{600nm}$  em espectrofotômetro observado em intervalos regulares de 2 horas até completar 12 horas.

O *screening* dos microrganismos foi realizado como descrito no subitem 3.1 considerando a capacidade de tolerância e biotransformação do AC em outros metabólitos.

### **3.5 Avaliação da bioconversão de ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol em meio sintético pela cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48**

O pré-inóculo consistiu de MLN descrito no subitem 3.2, porém acrescido de AC a 300 mg L<sup>-1</sup>, considerando todos os parâmetros do subitem 3.3, com a biomassa gerada sendo centrifugada a 15000 × g por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* obtido foi então lavado 3x em solução salina (NaCl 0,85%) e ressuspensionado na mesma solução. Após esse procedimento, foi inoculado na unidade experimental, com a suspensão necessária para atingir DO inicial de  $\cong 0,05 DO_{600nm}$ .

A unidade experimental consistiu de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de MLM descrito no subitem 3.2 iniciada com pH 6,0 acrescido de glicose a 500 mg L<sup>-1</sup> (0,05%) e AC a 300 mg L<sup>-1</sup> (0,03%). Os experimentos foram realizados em triplicata acompanhado do CA e CB. A cultura foi incubada a 28,0 °C sob agitação orbital de 150 rpm.

Na câmara de fluxo laminar foram retiradas 3 alíquotas de 2 mL a cada 15 minutos até completar uma hora de incubação. As alíquotas foram utilizadas para medição do crescimento bacteriano através da DO ( $DO_{600nm}$ ), aferimento do pH, determinar o consumo de glicose pela técnica de açúcar redutor e quantificar a biotransformação do AC aos metabólitos em CLAE.

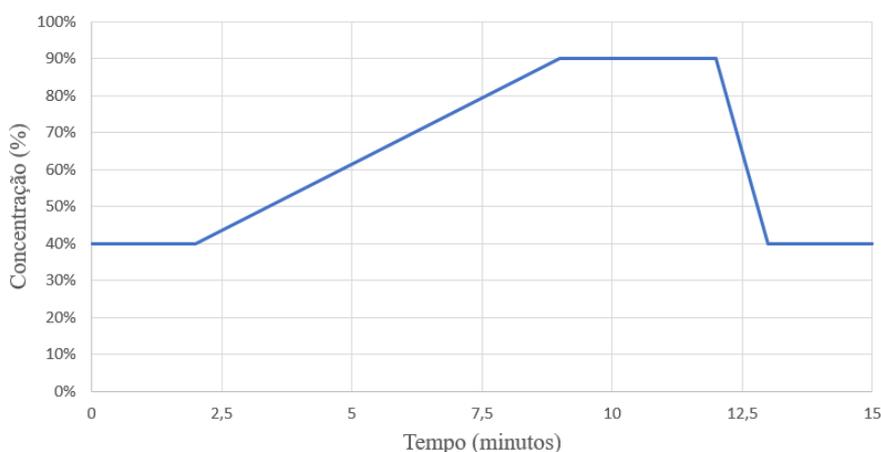
A bioconversão do AC também foi avaliada nas mesmas condições experimentais acima descritas, porém sem a adição de glicose ao meio.

### 3.6 Preparo de amostra e quantificação do ácido *p*-cumárico e do 4-vinilfenol por cromatografia líquida de alta eficiência

Após o processo de fermentação, o consumo de AC e a formação do 4VF foram quantificados por CLAE. Para tanto, antes das injeções, as amostras foram pré tratadas através de filtração em filtros de Teflon de 0.22  $\mu\text{m}$ , para eliminar qualquer sobrenadante presente. Após a filtragem, as amostras foram diluídas 3 vezes em metanol grau CLAE (volume total de 1,0 mL).

O método cromatográfico consistiu em eluição no modo gradiente, empregando como fases móveis: fase A ( $\text{H}_2\text{O}$  com 0,1% (volume:volume) de ácido trifluoroacético) e fase B (metanol com 0,1% (volume:volume) de ácido trifluoroacético). Foi empregada uma coluna de fase estacionária de octadecilsilano (C18), marca ThermoFischer Scientific. A eluição se deu seguindo as seguintes proporções: 40% de B de 0 a 2 min; de 40 a 90% de B de 2 a 9 min; 90% de B de 9 a 12 min; 40% de B de 12 a 13 min; mantido 40% de B até 15 min (final da corrida) (Figura 17). Volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , fluxo de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$ , detecção por espectrofotometria de UV-Vis (detector de arranjo de diodos) monitorando o comprimento de onda a 303 nm na quantificação de AC e a 254 nm na quantificação de 4VF, ambos nos comprimentos de onda onde os compostos apresentaram máxima absorbância.

**Figura 17** – Gradiente de eluição da fase B do método cromatográfico



**Fonte:** Autoria própria

As curvas de calibração do AC e do 4VF foram construídas utilizando-se os padrões analíticos destes compostos. Foram injetados 7 pontos nas concentrações de 15 a 100 mg L<sup>-1</sup>. Foi realizada a regressão linear dos pontos para a obtenção da curva analítica. As concentrações das amostras foram calculadas utilizando-se a equação da reta ( $y = a.x + b$ ), utilizando-se o coeficiente angular obtido na regressão linear.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação de tolerância das cepas ao ácido *p*-cumárico

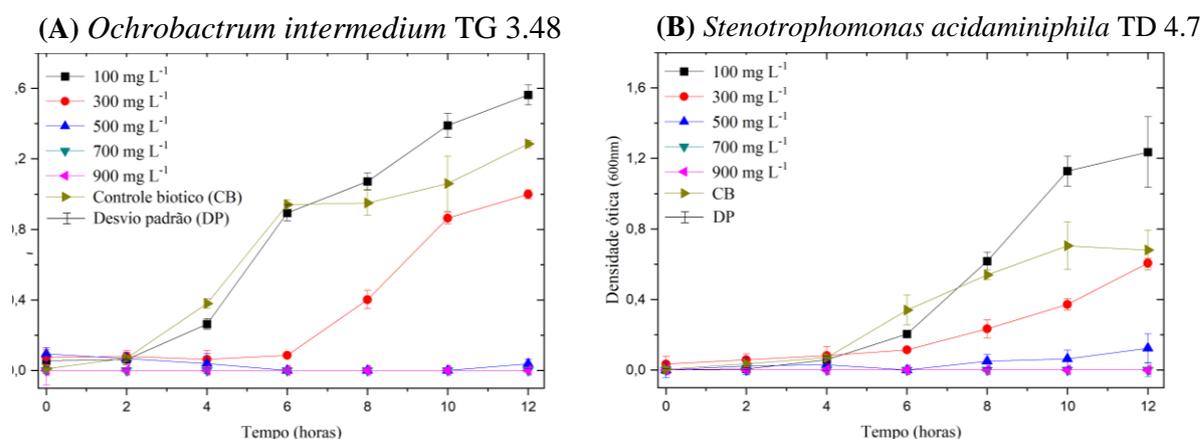
A proposta do trabalho incluiu a busca por cepas bacterianas tolerantes a concentrações consideráveis de AC, capazes de biotransformá-lo em outros compostos de valor agregado, principalmente o 4VF.

O primeiro ensaio realizado teve intuito de avaliar a tolerância das cepas bacterianas na presença de diferentes concentrações de AC (100, 300, 500, 700 e 900 mg L<sup>-1</sup>), sendo os dados obtidos utilizados como critério de seleção na triagem inicial das bactérias, considerando o aumento da biomassa em função do tempo. A triagem mostrou-se importante pois o AC e seus metabólitos podem agir como um bactericida, inviabilizando sua utilização na biotransformação. (LOU et al., 2012; PEI et al., 2016 MATTILA; PIHLAVA; HELLSTRÖM, 2005).

A *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 (Figura 18, A) mostrou-se mais tolerante a presença de AC na concentração máxima de 300 mg L<sup>-1</sup>, porém em maiores concentrações o crescimento da cepa foi completamente inibido.

**Figura 18** – Curva de crescimento das cepas (A) *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 e (B) *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7

[ ] mg L<sup>-1</sup> AC (ácido *p*-cumárico)

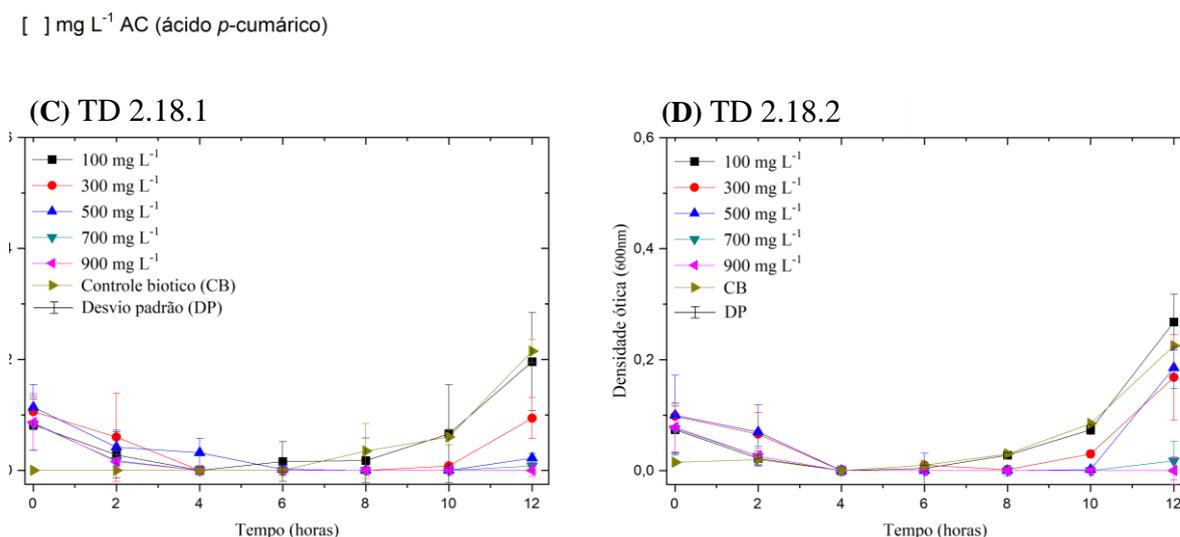


Fonte: Autoria própria

A cepa *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7 (Figura 18, B) revelou-se pouco tolerante a presença de AC no meio em comparação com CB, embora tenha havido um aumento da biomassa superior ao do CB a partir de 8h na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, indicando um possível início da desintoxicação ou utilização do composto como fonte de carbono no referido ponto (LUBBERS et al., 2019). Todavia a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> é muito baixa visando um possível aumento de escala da biotransformação e o baixo crescimento bacteriano inviabilizaram a continuidade dos experimentos com a cepa testada.

Os resultados observados das cepas não identificadas TD 2.18.1 e TD 2.18.2 (Figura 19, C e D) mostraram que ambas apresentam um crescimento relativamente lento, demonstrado pela curva de crescimento do CB praticamente idêntico ao da menor concentração do AC (100 mg L<sup>-1</sup>).

**Figura 19** – Curva de crescimento das cepas não identificadas (C) TD 2.18.1 e (D) TD 2.18.2



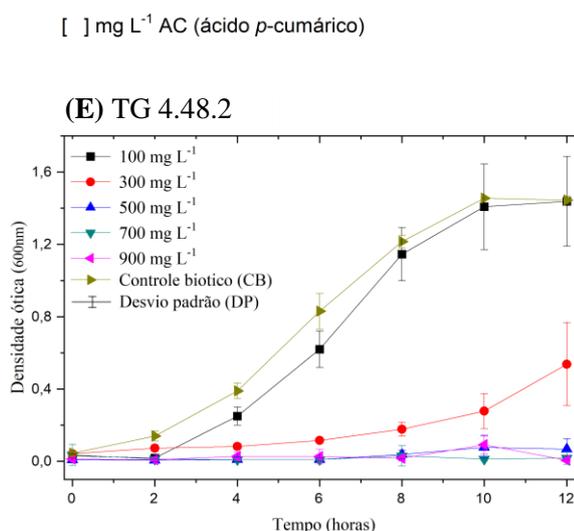
**Fonte:** Autoria própria

Notou-se, no entanto, uma maior capacidade de tolerância da cepa TD 2.18.2, apresentando crescimento de até 500 mg L<sup>-1</sup>. Entretanto não houve um aumento significativo da biomassa destas cepas durante a fermentação.

O baixo crescimento da biomassa bacteriana das cepas TD 2.18.1 e TD 2.18.2 (Figura 19, C e D) na faixa de tempo trabalhada inviabilizaram, portanto, a continuidade dos estudos com as cepas em questão.

A cepa não identificada TD 4.48.2 (Figura 20, E) mostrou-se não afetada significativamente pela presença de AC a 100 mg L<sup>-1</sup> apresentando uma curva de crescimento próxima da observada no CB. Porém, as maiores concentrações testadas mostraram-se com potencial altamente inibitório, reduzindo pela metade o crescimento observado em 300 mg L<sup>-1</sup> e sob as demais concentrações superiores inibindo quase que completamente o crescimento bacteriano.

**Figura 20** – Curva de crescimento da cepa não identificada (E) TG 4.48.2



Fonte: Autoria própria

O trabalho de revisão de GUZMAN (2014) comparou as MICs de várias cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas na presença de AC, demonstrando grandes variações nos valores em função da espécie ou linhagem bacteriana. Como exemplo pode-se citar as cepas bacterianas Gram-negativas *Salmonella typhimurium* #450 com CIM de 498 mg L<sup>-1</sup> (LOU et al., 2012) e a *Salmonella typhimurium* 50013 com CIM de 20 mg L<sup>-1</sup> (SG; DE; MA, 2008), revelando uma diferença significativa de tolerância em cepas da mesma espécie.

Embora o AC apresente um valor de CIM muito variável entre as cepas bacterianas o composto apresenta um potencial tóxico aos microrganismos superior ao do ácido cinâmico.

Os isômeros estruturais de AC (ácido *meta*-cumárico e ácido *orto*-cumárico) são menos comuns na natureza, sendo em comparação ao AC pouco estudados (GUZMAN, 2014).

Portanto considerando os dados obtidos relativos à tolerância ao AC nas cepas bacterianas foi comprovada a ação bactericida dele em todas as cepas. No entanto, a cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 (Figura 27, A) revelou-se a mais tolerante, apresentando um crescimento bacteriano expressivo a 300 mg L<sup>-1</sup>. As cepas *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7 (Figura 28, B) e TD 4.48.2 (Figura 29, E) entretanto foram consideradas com crescimento satisfatório próximo de 200 mg L<sup>-1</sup>.

As demais cepas não identificadas TD 2.18.1 e TD 2.18.2 (Figura 28, C e D) não tiveram crescimento bacteriano relevante em nenhuma concentração de AC, indicando baixa tolerância ao AC e, portanto, excluindo estas bactérias de estudos subsequentes de biotransformação. Além disso, estas cepas também não apresentaram crescimento no CB, fato este que ainda carece de uma explicação a luz de novos experimentos.

Por fim, as cepas *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD 4.7 e TD 4.48.2 foram selecionadas para a parte posterior do trabalho (*Screening*).

## **4.2 Avaliação da bioconversão de ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol em meio sintético**

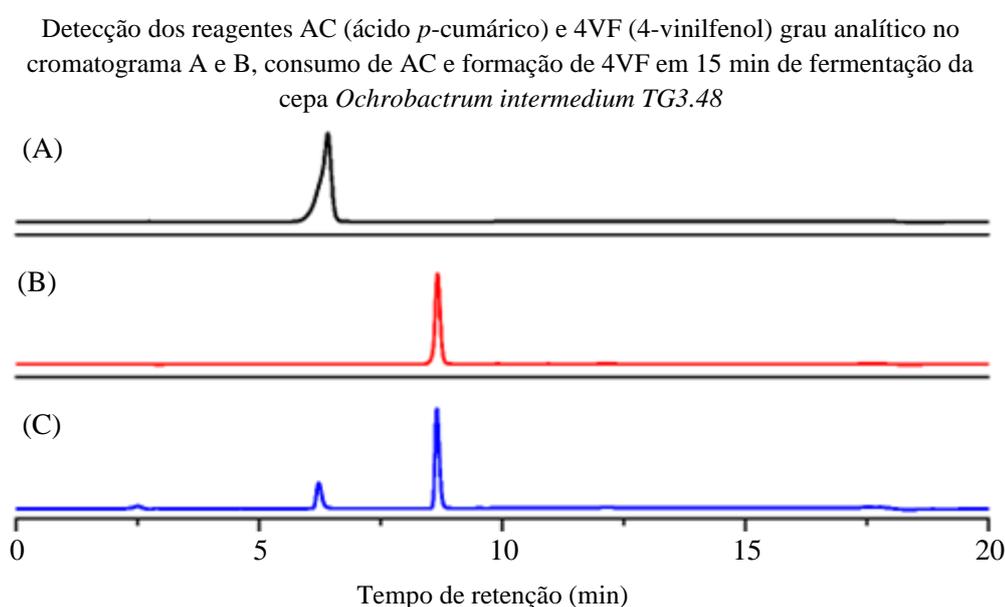
### **4.2.1 *Screening* das cepas bacterianas**

Os resultados coletados no ensaio de tolerância à presença de AC sob múltiplas concentrações foram utilizados como critério preliminar de seleção, eliminando as cepas não identificadas TD 2.18.1 e TD 2.18.2 da continuidade do trabalho. O *screening* é uma técnica importante para avaliação das cepas resistentes ao AC e capazes de biotransformá-lo.

O consumo de AC e a formação dos metabólitos foram acompanhadas por CLAE. Para todas as cepas bacterianas, foi observado o consumo em diferentes porcentagens do AC, cujo cromatograma é mostrado na Figura 21 (A) (tempo de retenção de 6,40 minutos) e a formação de somente um produto. Como esperado, o produto formado foi identificado como sendo o 4VF, através da injeção do seu padrão analítico, cujo cromatograma é mostrado na Figura 21 (B) (tempo de retenção de 8,67 minutos).

O cromatograma da Figura 21 (C) ilustra a injeção de uma das alíquotas (30 minutos) retiradas durante a bioconversão utilizando a cepa *Ochrobactrum intermedium*. Foram observados somente os picos relativos ao reagente de partida e do produto, indicando que a conversão se deu de forma direta, sem a detecção de outros produtos de reação.

**Figura 21** – Cromatogramas referentes aos padrões dos reagentes AC (A), 4VF (B) em conjunto da obtida durante a bioconversão da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48(C) em uma hora de fermentação.



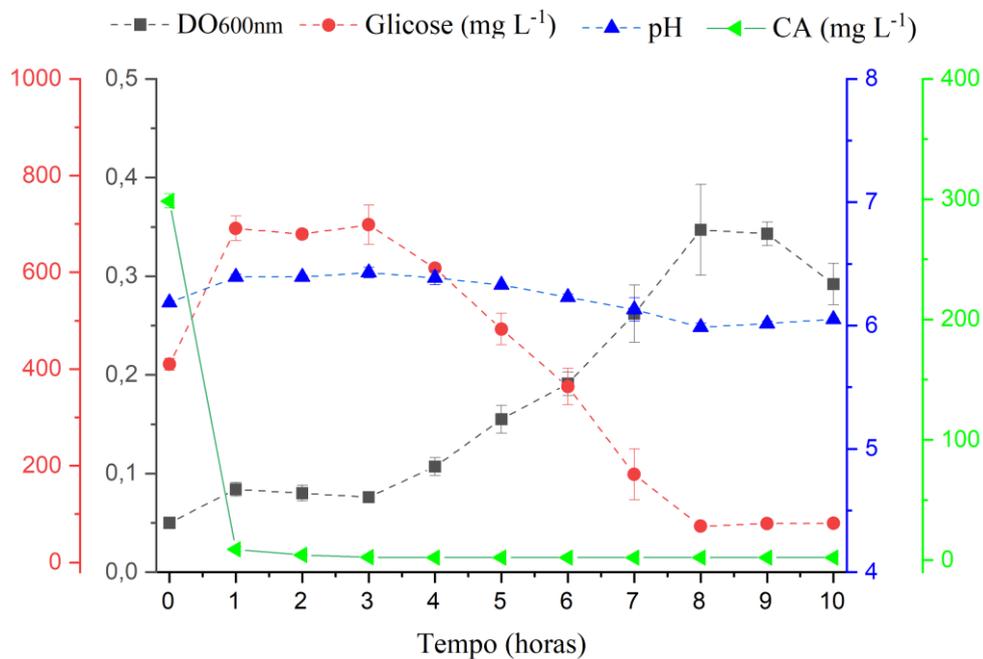
**Fonte:** Autoria própria

Considerando as cepas bacterianas *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 e isolada TG 4.48.2, as mais adequadas para a continuidade do trabalho, foi realizado um ensaio de 48 horas, retirando alíquotas em intervalos regulares de 4 horas. Foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento bacteriano em espectrofotômetro ( $DO_{600nm}$ ), consumo de glicose através da técnica de açúcar redutor DNS, alterações de pH e o consumo de AC por CLAE.

No *screening*, a cepa isolada TG 4.48.2 mostrou-se incapaz de consumir o AC na concentração de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , com isso a cepa em questão foi eliminada da continuidade dos trabalhos experimentais.

A cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 mostrou-se capaz de consumir até 300 mg L<sup>-1</sup> de AC quase completamente nas primeiras horas de coleta, exigindo um experimento complementar para melhor visualização da curva de consumo, proposta inicialmente em uma fermentação de 10 horas (Figura 22) com retiradas das alíquotas em espaços de tempo de uma hora.

**Figura 22** – *Screening* da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, mensurando o crescimento bacteriano, alteração do pH, em conjunto das variações na concentração de AC e glicose disponíveis no meio



Fonte: Autoria própria

Deste modo, o próximo experimento foi proposto como uma fermentação de 3 horas, retirando-se as alíquotas em intervalos regulares de 15 minutos no intuito de visualizar o decréscimo de AC, desta vez quantificando o 4VF.

Além disso, foi observado um aumento significativo na concentração de glicose até 3 horas de fermentação. Este comportamento não era esperado, visto que a concentração de glicose deveria ser consumida ou mantida estável durante o processo de fermentação, não havendo possibilidade de aumento de sua concentração.

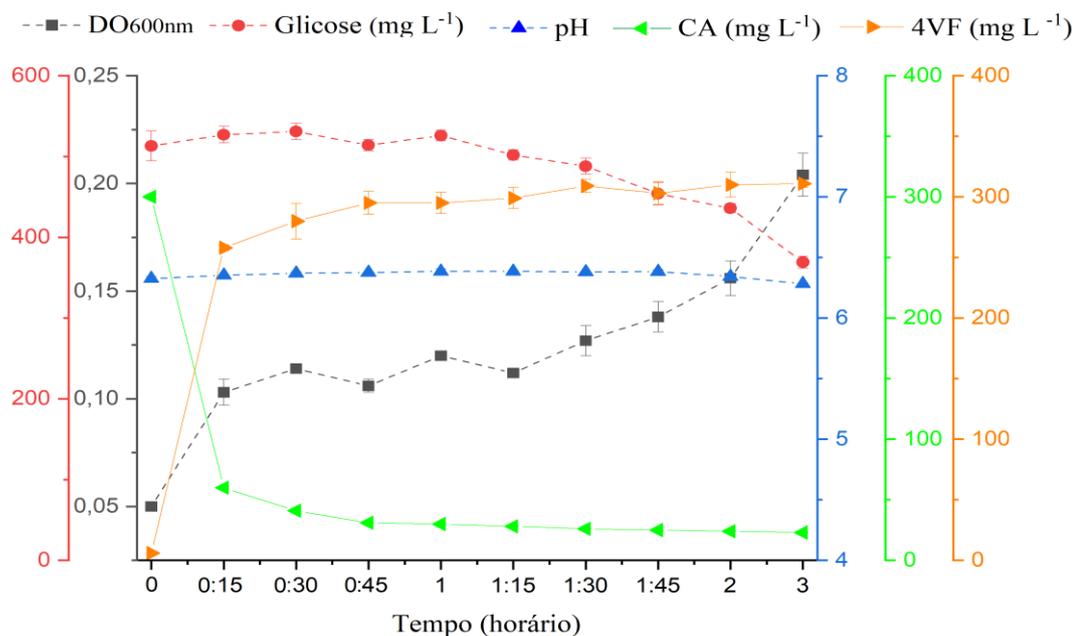
#### 4.2.2 Biotransformação do ácido *p*-cumárico a 4-vinilfenol pela cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48

Os resultados apresentados na bioconversão bacteriana foram quantificados por CLAE, de acordo com a metodologia descrita no subitem 3.6. Os tempos de retenção obtidos confirmaram somente a presença de AC e 4VF na solução modelo, demonstrados na Figura 21.

Além da mudança no tempo de fermentação proposto, os parâmetros definidos de avaliação do potencial de biotransformação da cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 foram revisados. Foi observado que um aumento da concentração de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) de 0,11% para 1,1% (massa:volume) na solução proporcionou um ganho significativo em biomassa da referida cepa bacteriana. Portanto, este acréscimo na fonte de nitrogênio presente na fermentação foi mantido nos ensaios posteriores.

A avaliação da bioconversão de AC a 4VF pela cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 ocorreu em um período de 3 horas, com a retirada das alíquotas de 15 em 15 minutos até as 2 horas e com uma única coleta ao final das 3 horas (Figura 23).

**Figura 23** – Perfil de crescimento bacteriano da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, consumo de AC, formação de 4VF, e pH em meio de cultura acrescido de glicose



Fonte: Autoria própria

A curva relativa ao AC na Figura 23 indica que em 15 minutos de incubação aproximadamente 80% do AC foi consumido, indicando uma assimilação bastante rápida do AC. Após 3 horas de incubação, a concentração inicial de AC foi reduzida a 92%. Observa-se que simultaneamente ao decaimento da concentração do AC ocorreu um aumento gradativo do 4VF, atingindo em 3 horas de fermentação um rendimento de 92%. Nota-se que as duas curvas, de consumo do AC e de geração do 4VF são inversamente proporcionais, indicando uma conversão direta de alto rendimento.

Houve durante a fermentação um aumento contínuo da biomassa, quadriplicando ao final das 3 horas.

Outro ponto importante é o comportamento da glicose, conforme descrito no item anterior (Figura 22) visto que o aumento da concentração de glicose não era esperado. Portanto, foram realizados experimentos para explicar este fato experimental. A biomassa foi inserida a partir do ponto zero (anteriormente coletada sem o inóculo inicial) e a conservação das alíquotas retiradas foi feita em um refrigerador 5 °C durante os intervalos de coleta.

Após o término da fermentação as alíquotas foram imediatamente centrifugadas a 15000 × g por 2 minutos, descartando o *pellet* e utilizando sobrenadante recém separado da biomassa para avaliação da concentração de açúcar pela reação de DNS. Utilizando esta metodologia, observa-se que a concentração da glicose permaneceu praticamente constante na fermentação, comportamento este esperado. Logo, o aumento da glicose observado na Figura 22 pode ser explicado pela forma com que as amostras estavam sendo armazenadas anteriormente as análises. As alíquotas eram estocadas em *freezer* a -20 °C, descongeladas e centrifugadas e posteriormente analisadas. O congelamento das amostras contendo MLM acrescidos da biomassa relativo aos tempos nos quais foram realizadas as amostragens, pode ter trazido consigo a glicose intracelular oriunda do pré-inóculo (MLN acrescido de glicose 2%) liberada no meio mediante a lise celular desencadeada pelo processo de cristalização do conteúdo citoplasmático a -20 °C. Logo, quando as amostras não foram congeladas, não houve a lise celular e, portanto, os níveis de glicose se mantiveram dentro do esperado (SHEN; ZHOU; LIU, 2012).

O comportamento da concentração de glicose, sugere que a cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 apresenta um perfil típico de desintoxicação no meio de cultivo. Ou seja, a confirmação do potencial tóxico do AC e a concentração constante de glicose observados na primeira hora de fermentação, sugerem que a referida cepa bacteriana tem

inicialmente priorizado a conversão do AC pelo seu derivado menos inibitório, sendo esta bioconversão parte de um mecanismo fundamental para a continuidade do crescimento bacteriano normal.

TORRES E TORRES; ROSAZZA, (2001) realizou um *screening* de microrganismos capazes de expressar rotas de bioconversão de AC a seus principais metabolitos relatados, incluindo o 4VF, cultivados em meio sintético analisando a ocorrência dos compostos com base na cromatografia de camada delgada. A triagem mostrou o potencial da cepa *Bacillus megaterium* em biotransformar o AC a 4VF, cultivada em uma fermentação de 24 horas, acrescida de 800 mg L<sup>-1</sup> de AC, foram retiradas alíquotas após 6 e 24 horas que apresentaram os resultados respectivos de 40 e 50% de rendimento na bioconversão a 4VF.

SALGADO et al. (2014) estudou a biotransformação bacteriana de AC a 4VF e AF a 4-vinilguaicol de uma cepa recombinante de *Escherichia coli* na expressão do gene PAD de *Lactobacillus plantarum*, em uma fermentação extrativa do hidrolisado alcalino de espiga de milho, sob várias condições: bruto, pré-tratado desintoxicado e não desintoxicado, empregando células livres e imobilizadas em meio bifásico aquoso-orgânico. Os resultados deste estudo demonstraram a capacidade da cepa recombinante na produção de 4VF, principalmente nos hidrolisados pré-tratados desintoxicados, alcançando um rendimento na geração de 4VF de 86% (concentração inicial de AC de 1525 mg L<sup>-1</sup>) em 24 horas de fermentação.

Outro trabalho similar, proposto por RODRIGUEZ et al. (2021) estudou a biotransformação bacteriana de AC a 4VF em cepas recombinantes de *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* na expressão do gene PAD de *Bacillus amyloliquefaciens* na fermentação extrativa em hidrolisado de palha de milho. O referido estudo foi realizado com células livres, analisando a produção de 4VF mediante a quantificação em CLAE. A bioconversão da *Corynebacterium glutamicum* recombinante resultou em altas concentrações de 4VF em meio sintético, tendo todos os melhores resultados das cepas alcançados ao usar undecanol para extração. A *Escherichia coli* todavia destacou-se como o organismo de melhor desempenho no hidrolisado lignolítico, apresentando um rendimento de 90% na produção de 21 g L<sup>-1</sup> de 4VF em 12 horas fermentação, demonstrando o potencial da cepa na fermentação extrativa para produção biológica e recuperação de 4VF em escalas mais altas.

Como existem vários relatos na literatura da inibição da enzima PAD na reação de descarboxilação do AC a 4VF em meios contendo concentrações superiores a 1000 mg L<sup>-1</sup> de 4VF uma das principais estratégias que tem sido exploradas para mitigar esse problema é o

sistema bifásico aquoso-orgânico em meios de cultivo e reatores bifásicos de batelada alimentada ou contínuo.

Os estudos mencionados de biotransformação de cepas bacterianas de AC a 4VF realizados em meios sintéticos e hidrolisados estão expostos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Comparação entre estudos de biotransformação de cepa bacterianas de CA a 4VF sob meios de cultivo e condições variadas

| Referência                          | Meio de cultura                   | Tempo final (horas) | [AC] inicial<br>g L <sup>-1</sup> | [4VF] final<br>g L <sup>-1</sup> | Rendimento |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------|
| TORRES E TORRES;<br>ROSAZZA, (2001) | Sintético                         | 24                  | 0,8<br>g L <sup>-1</sup>          | -                                | 50%        |
| JUNG et al. (2013)                  | Sintético                         | 12                  | 49<br>g L <sup>-1</sup>           | 31,9<br>g L <sup>-1</sup>        | 88,7%      |
| SALGADO et al.,<br>(2014)           | Hidrolisado de<br>espiga de milho | 24                  | 1,5<br>g L <sup>-1</sup>          | 1<br>g L <sup>-1</sup>           | 86%        |
| RODRIGUEZ et al.<br>(2021)          | Hidrolisado de<br>palha de milho  | 12                  | 8<br>g L <sup>-1</sup>            | 21<br>g L <sup>-1</sup>          | 90%        |

**Fonte:** Autoria própria

A cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 do referente ensaio proposto mostrou-se capaz de biotransformar AC a 300 mg L<sup>-1</sup> a 4VF, apresentando rendimento de 92% de eficiência após 3 horas de fermentação, sob as condições de cultivo determinadas no ensaio.

Embora já exista na literatura estudos com concentrações superiores de AC e de capacidade de biotransformação elevada em meio sintético (JUNG et al., 2016) e hidrolisado (RODRIGUEZ et al., 2021) que a relatada neste trabalho, o potencial da cepa *Ochrobactrum intermedium* continua promissor, visto que a maior parte da bioconversão ocorre logo nos primeiros 15 minutos de fermentação, portanto, ensaios futuros em hidrolisado lignolítico podem mostrar-se bastante atrativos comercialmente. No entanto, os rendimentos da bioconversão costumam diminuir em meio complexo como os hidrolisados, logo o tratamento

adequado do licor e o uso de um sistema de bifásico aplicado em cepa recombinante imobilizada ou da enzima heteróloga imobilizada são possibilidades que podem contrapor os desafios inerentes ao processo.

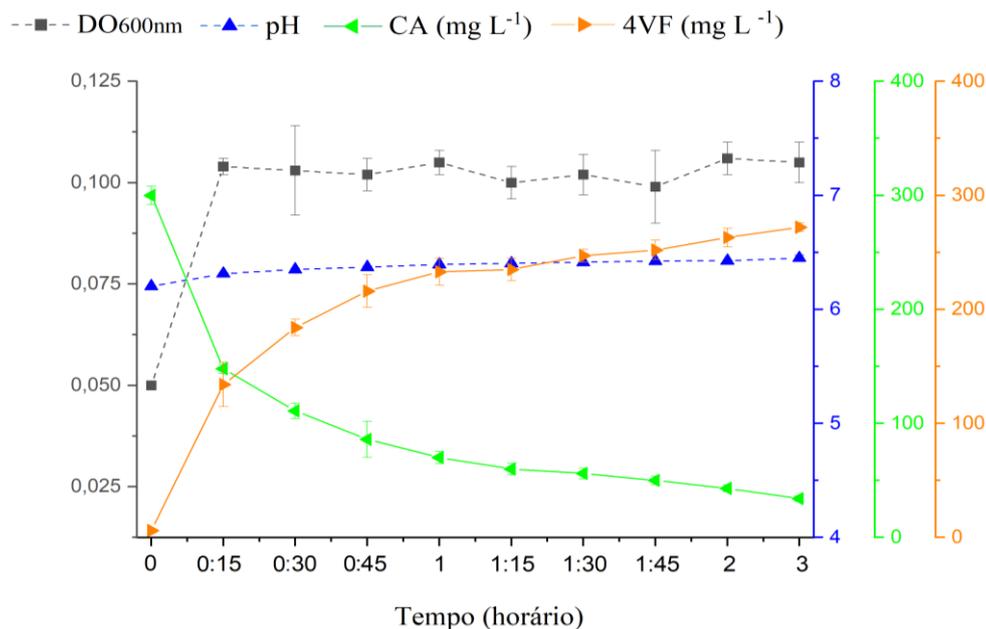
### **4.3 Biotransformação do ácido p-cumárico a 4-vinilfenol pela cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 em meio de cultura ausente de glicose**

O ensaio de avaliação do crescimento bacteriano da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 (Figura 24) sob efeito da concentração de AC a  $300 \text{ mg L}^{-1}$  mostrou-se com um perfil típico de desintoxicação, priorizando inicialmente a substituição do AC presente no meio de cultivo para continuidade do crescimento bacteriano normal.

Baseado nos dados obtidos nos ensaios discutidos anteriormente foi observado que a bioconversão do AC a  $300 \text{ mg L}^{-1}$  em 4VF poderia acontecer independentemente da presença de glicose no meio de cultura.

Então, buscando confirmação da premissa acima mencionada foi proposto uma avaliação do perfil de crescimento bacteriano da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 sob concentração de AC a  $300 \text{ mg L}^{-1}$  em meio de cultivo ausente de glicose, realizado sob as condições de cultivo padronizadas do ensaio anterior (Figura 24).

**Figura 24** – Perfil de crescimento bacteriano da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, consumo de AC, formação de 4VF, e pH em meio de cultura ausente de glicose



Fonte: Autoria própria

O ensaio mostrou que o pH permaneceu inalterado comparado ao ensaio anterior na presença de glicose. Todavia, o crescimento bacteriano foi reduzido pela metade, tendo o rendimento de 4VF na bioconversão do AC sendo mais afetado somente na primeira uma hora de fermentação, contudo, ao fim das 3 horas foi alcançado um rendimento de 89% próximo ao de 92% do meio contendo glicose. Logo, foi confirmado a capacidade da cepa de realizar a bioconversão em meio ausente de glicose, porém com o rendimento na bioconversão um pouco reduzido.

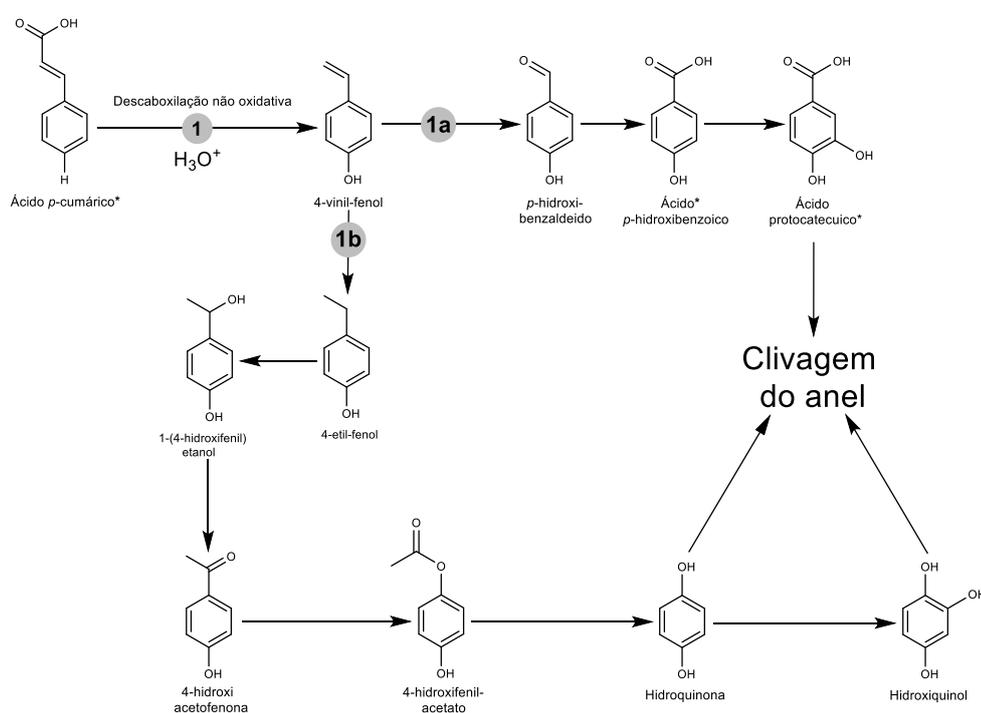
Como a diminuição do consumo de AC de após 3 horas de fermentação foi acompanhada do rendimento em igual proporção, houve uma queda pouco expressiva na geração de 4VF se comparado ao ensaio em meio contendo glicose.

Embora não exista na literatura relatos de pesquisas de biotransformação bacteriana de AC a 4VF em meio sintético ausente de fontes adicionais de carbono, a revisão de SHEN; ZHOU; LIU, (2012) organizou as vias metabólicas de biodegradação de compostos aromáticos homocíclicos identificados na cepa bacteriana *Corynebacterium glutamicum*, incluindo o AC. Os autores sugeriram que a cepa bacteriana em questão possa crescer em meio seletivo contendo

como única fonte de carbono um dos compostos aromáticos referidos, embora novas pesquisas sejam essenciais para confirmação dessa hipótese.

As diferentes vias metabólicas de biotransformação do AC pela cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 que foram sugeridas estão representadas na Figura 25.

**Figura 25** – Vias de biotransformação do AC em bactérias e geração de compostos aromáticos derivados



Fonte: Autoria própria

Como não foi observado o surgimento de outros compostos em CLAE, é mais provável portanto que a ocorrência desses metabólitos sugeridos ocorra em estágios mais tardios da fermentação na condição limitante de cultivo, pois a conversão de 4VF apresentou rendimento elevado, não sendo observado o decaimento da concentração de 4VF e formação de metabólitos relacionados e etapas futuras da assimilação, explicando com isso a redução da biomassa observada se comparada ao experimento contendo glicose.

A cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 mostrou-se capaz de realizar a bioconversão de AC a 4VF em meio sintético desprovido de fontes de carbono adicionais, porém com rendimento de 89% na bioconversão em 3 horas de fermentação. A

biotransformação bacteriana de AC em meios contendo o composto como única fonte de carbono mostra-se uma excelente opção na geração dos produtos de maior valor agregado, pois pode diminuir os custos relacionados ao processo de produção biológica de 4VF.

## 5 CONCLUSÕES

Os dados experimentais coletados até o presente, indicaram que das 5 cepas bacterianas inicialmente selecionadas, somente a cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48, foi capaz de tolerar o AC em uma concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> não afetando de forma expressiva seu crescimento. A cepa acima referida foi capaz de biotransformar o AC em 4VF com conversão e rendimento de 92% em 3 horas de fermentação. As análises de CLAE, utilizadas para a quantificação do consumo de AC e formação de 4VF, não indicaram a presença de outros compostos, sugerindo que a biotransformação se deu de forma direta.

A biotransformação também foi conduzida em meio na ausência de glicose. Os resultados indicaram que a cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 foi capaz de aumentar sua biomassa sem a presença de glicose, porém, a conversão de AC diminuiu para 89% e o rendimento na geração de 4VF foi reduzido a 89%. Acredita-se a bactéria possa usar o AC como única fonte de carbono, contudo, não foi possível observar a surgimento de outros metabólitos além do 4VF.

## REFERÊNCIAS

- AB RASID, N. S. et al. Recent advances in green pre-treatment methods of lignocellulosic biomass for enhanced biofuel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 321, p. 129038, 2021.
- AKIN, D. E. Forage cell wall degradation and  $\rho$ -coumaric, ferulic, and sinapic acids. **Agronomy Journal**, v. 74, n. 3, p. 424–428, 1982.
- AKIN, D. E. Plant cell wall aromatics: Influence on degradation of biomass. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**, p. 288–303, 2008.
- ARNI, S. AL. Extraction and isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: A review. **Industrial Crops and Products**, p. 330–339, 2018.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- 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, 2007.
- BETTACH, N. et al. A simplified wittig synthesis using a solid/liquid transfer process. VIII - Specific behaviour of methyltriphenylphosphorane during condensation with phenolic aldehydes. **Synthetic Communications**, v. 22, n. 4, p. 513–518, 1992.
- BOULTON, R. B. et al. **Principles and Practices of Winemaking**. 1. ed. Boston: Springer, 1996.
- BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653–73, 1941.
- CALVO-FLORES, F. G.; DOBADO, J. A. Lignin as renewable raw material. **ChemSusChem**, v. 3, n. 11, p. 1227–1235, 2010.
- CARDOSO, M.; DE OLIVEIRA, É. D.; PASSOS, M. L. Chemical composition and physical properties of black liquors and their effects on liquor recovery operation in Brazilian pulp mills. **Fuel**, v. 88, n. 4, p. 756–763, 2009.
- CARVALHO, M. L. DE. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de**

**cana-de-açúcar**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/4075?show=full>>.

CAVIN, J. F.; BARTHELMEBS, L.; DIVIÈS, C. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: Gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1939–1944, 1997.

CAVIN, J. F.; DARTOIS, V.; DIVIÈS, C. Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 9–13, 1997.

CGEE. CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Química verde no Brasil: 2010 - 2030**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. 2010. Disponível em: <[https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/Livro\\_Quimica\\_Verde\\_9560.pdf](https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/Livro_Quimica_Verde_9560.pdf)>.

CHIO, C.; SAIN, M.; QIN, W. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p. 232–249, 2019.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362–372, 1999.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perfil do setor do açúcar e etanol no Brasil**: Edição para a safra 2015/16. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>.

DALE, W. J.; HENNIS, H. E. Substituted Styrenes. III. The syntheses and some chemical properties of the vinylphenols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 14, p. 3645–3649, 1958.

DAS, A. B.; GOUD, V. V.; DAS, C. Phenolic compounds as functional ingredients in beverages. *In*: GRUMEZESCU, A. M. et al. **Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages**. Londres: Academic Press, 2019. p. 285–323.

DAVIS, C. R. et al. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 539–545, 1986.

DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic compounds. *In*: YAHIA, E. M. **Postharvest Physiology**

**and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Queretaro: Elsevier, 2018. p. 253-271.

DEGRASSI, G.; DE LAURETO, P. 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. 326–332, 1995.

DEMUNER, I. F. et al. Improving kraft pulp mill sustainability by lignosulfonates production from processes residues. **Journal of Cleaner Production**, v. 317, 2021.

DOS SANTOS, M. B. C. et al. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1649, 2021.

DUGELAY, I. et al. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 2092–2096, 1993.

ECOLIG. **Ecolig - Da Natureza para a Inovação**. Disponível em: <<https://www.suzanoecolig.com.br/>>. Acesso em: 7 mar. 2022.

ERAGHI KAZZAZ, A.; FATEHI, P. Technical lignin and its potential modification routes: A mini-review. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112732, 2020.

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. **Pulp and paper capacities survey /Capacités de la pâte et du papier enquête/Capacidades de pasta y papel estudio 2018–2023**. Roma: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, 2018. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/i4794t/i4794t.pdf>>.

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. **Global Forest Products 2018**. Roma: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, 2020. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb0513m/CB0513M.pdf>>.

FIEGE, H. et al. Phenol derivatives. *In*: ULLMAN, F. et al. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Berlin: Wiley, 2012. p. 503-519.

FRAS, P. et al. Production of volatile phenols by *Lactobacillus plantarum* in wine conditions. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 2, p. 281–285, 2014.

GOMES, F. A. **Avaliação dos processos Kraft convencional e Lo-Solids® para madeira de Pinus taeda**. 2009. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-23062009-083702/pt-br.php>>.

GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science Society of America**, 2005.

GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19293–19339, 2020.

JIN, W. et al. Efficient extraction of lignin from black liquor via a novel membrane-assisted electrochemical approach. **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 611–618, 2013.

JUNG, D. H. et al. Bioconversion of *p*-coumaric acid to *p*-hydroxystyrene using phenolic acid decarboxylase from *B. amyloliquefaciens* in biphasic reaction system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1501–1511, 2013.

JUNG, D. H. et al. Production of *p*-hydroxybenzoic acid from *p*-coumaric acid by *Burkholderia glumae* BGR1. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 7, p. 1493–1503, 2016.

JYOTHI, R.; JIMCY, T.; MANOHAR, S. Production of *p*-hydroxybenzoic acid and caffeic acid from *p*-coumaric acid using *Streptomyces caeruleus* MTCC 6638. **Indian Journal of Biotechnology (IJBT)**, v. 17, n. 1, p. 189–192, 2018.

KOUTINAS, A. A. et al. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 8, p. 2587–2627, 2014.

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 4, n. 1, p. 86–93, 2020.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, n. 1, p. 86–93, 2014.

LIN, Y.; YAN, Y. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2014.

LINGER, J. G. et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

- America**, v. 111, n. 33, p. 12013–12018, 2014.
- LOU, Z. et al. *p*-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550–554, 2012.
- LU, Q. et al. Catalytic fast pyrolysis of alkali-pretreated bagasse for selective preparation of 4-vinylphenol. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 143, p. 104669, 2019.
- LUBBERS, R. J. M. et al. A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107396, 2019.
- MATTILA, P.; PIHLAVA, J. M.; HELLSTRÖM, J. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8290–8295, 2005.
- MENDES, F. M. et al. Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 314–321, 2018.
- MORAES, F. DE A. B.; PIRATELLI, C. L.; ACHCAR, J. A. Optimal conditions for wood consumption in cellulose production. **Producao**, v. 24, n. 3, p. 712–724, 2014.
- MOSHKELANI, M. et al. The forest biorefinery and its implementation in the pulp and paper industry: Energy overview. **Applied Thermal Engineering**, v. 50, n. 2, p. 1427–1436, 2013.
- MURKOVIC, M. Phenolic compounds. *In*: ABALOS, E. et al. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Londres: Academic Press, 2003, p. 4507–4514.
- MUTHUVELU, K. S. et al. Evaluation and characterization of novel sources of sustainable lignocellulosic residues for bioethanol production using ultrasound-assisted alkaline pretreatment. **Waste Management**, v. 87, p. 368–374, 2019.
- PAZ, A. et al. Biotransformation of phenolic compounds by *Bacillus aryabhatai*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 10, p. 1671–1679, 2019.
- PEI, K. et al. *p*-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952–2962, 2016.
- PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and

lignin: An overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

POLA, L. et al. Characterisation of the wet oxidation of black liquor for its integration in Kraft paper mills. **Chemical Engineering Journal**, v. 405, p. 126610, 2021.

RAGAUSKAS, A. J. et al. Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, 2014.

RODRIGUEZ, A. et al. Evaluation of bacterial hosts for conversion of lignin-derived *p*-coumaric acid to 4-vinylphenol. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2021.

SACHAN, A. et al. Co-production of caffeic acid and *p*-hydroxybenzoic acid from *p*-coumaric acid by *Streptomyces caeruleus* MTCC 6638. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 720–727, 2006.

SALGADO, J. M. et al. Bioproduction of 4-vinylphenol from corn cob alkaline hydrolyzate in two-phase extractive fermentation using free or immobilized recombinant *E. coli* expressing pad gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58–59, p. 22–28, 2014.

SARSAIYA, S. et al. Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121905, 2019.

PARKAR, S. G.; STEVENSON, D. E.; SKINNER, M. A. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. **International journal of food microbiology**, v. 124, n. 3, p. 295–298, 2008.

SHEN, X. H.; ZHOU, N. Y.; LIU, S. J. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: Another potential for applications for this bacterium?. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 77–89, 2012.

SIMPSON, C. J.; FITZHENRY, M. J.; STAMFORD, N. P. J. Preparation of vinylphenols from 2- and 4-hydroxybenzaldehydes. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 40, p. 6893–6896, 2005.

SINHA, A. K.; SHARMA, A.; JOSHI, B. P. One-pot two-step synthesis of 4-vinylphenols from 4-hydroxy substituted benzaldehydes under microwave irradiation: a new perspective on the classical Knoevenagel-Doebner reaction. **Tetrahedron**, v. 63, n. 4, p. 960–965, 2007.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

SURYADI, H. et al. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, v. 8, p. e08865, 2022.

TORRES Y TORRES, J. L.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial transformations of *p*-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1408–1414, 2001.

TUCK, C. O. et al. Valorization of biomass: Deriving more value from waste. **Science**, v. 337, n. 6095, p. 695–699, 2012.

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. *In*: CAMPOS, M. R. S. **Bioactive compounds: Health benefits and potential applications**. Cambridge: Woodhead publishing, 2018, p. 33–50.

W. VERMERRIS, NICHOLSON, R. **Phenolic Compound Biochemistry**. 1. ed. Amsterdã: Springer, 2009. p. 3–6.

WAGLE, A. et al. Multi-stage pre-treatment of lignocellulosic biomass for multi-product biorefinery: A review. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 49, p. 101702, 2022.

WANG, T. YANG; LI, Q.; BI, K. SHUN. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12–23, 2018.

WITHERS, S. et al. Identification of grass-specific enzyme that acylates monolignols with *p*-coumarate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 8347–8355, 2012.

ZEVALLOS TORRES, L. A. et al. Lignin as a potential source of high-added value compounds: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 263, p. 121499, 2020.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367–375, 2008.

**APÊNDICE A - Dados de quantificação do ácido *p*-cumárico (CA) e 4-vinilfenol (4VF) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 em meio contendo glicose**

A quantificação de AC no experimento de biotransformação da cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 em meio contendo glicose foi realizada com 3 injeções por amostras analisadas no comprimento de onda 303 nm.

**APÊNDICE B - Tabela de valores obtidos na quantificação de AC durante a fermentação de 3 horas da cepa *Ochrobactrum intermedium* em MLM contendo glicose**

| Amostra            | Analito/ área |                        |                        | Média    | DP (%) | mg L <sup>-1</sup> |
|--------------------|---------------|------------------------|------------------------|----------|--------|--------------------|
|                    | Nome          | 1 <sup>a</sup> injeção | 2 <sup>a</sup> injeção |          |        |                    |
| Réplica 1 (15 min) | 1742693       | 1742256                | 1743142                | 1742697  | 0,02   | 59                 |
| Réplica 2 (15 min) | 1784842       | 1785018                | 1784646                | 1784835  | 0,01   | 60                 |
| Réplica 3 (15 min) | 1825965       | 1827315                | 1827088                | 1826789  | 0,03   | 61                 |
| CA (15 min)        | 11758809      | 11787486               | 11756338               | 11767544 | 0,14   | 278                |
| Réplica 1 (30 min) | 1022599       | 1022949                | 1021947                | 1022498  | 0,04   | 44                 |
| Réplica 2 (30 min) | 904746        | 904919                 | 904523                 | 904729   | 0,02   | 41                 |
| Réplica 3 (30 min) | 819178        | 846883                 | 815396                 | 827152   | 2,07   | 39                 |
| CA (30 min)        | 11517520      | 11514379               | 11521188               | 11517695 | 0,02   | 273                |
| Réplica 1 (45 min) | 425682        | 425981                 | 424686                 | 425449   | 0,15   | 31                 |
| Réplica 2 (45 min) | 430628        | 431592                 | 431420                 | 431213   | 0,11   | 31                 |
| Réplica 3 (45 min) | 454415        | 455736                 | 454990                 | 455047   | 0,14   | 31                 |
| CA (45 min)        | 12006657      | 12003613               | 12007760               | 12006010 | 0,01   | 283                |
| Réplica 1 (60 min) | 410528        | 410792                 | 410416                 | 410578   | 0,04   | 30                 |
| Réplica 2 (60 min) | 370422        | 370665                 | 370059                 | 370382   | 0,08   | 29                 |
| Réplica 3 (60 min) | 419300        | 419218                 | 418830                 | 419116   | 0,05   | 30                 |
| CA (60 min)        | 12483479      | 12476676               | 12472758               | 12477637 | 0,04   | 294                |
| Réplica 1 (75 min) | 291386        | 292957                 | 291703                 | 292015   | 0,28   | 28                 |
| Réplica 2 (75 min) | 271968        | 271815                 | 271447                 | 271743   | 0,09   | 27                 |
| Réplica 3 (75 min) | 291628        | 291417                 | 291079                 | 291374   | 0,09   | 28                 |
| CA (75 min)        | 11656866      | 11655318               | 11655484               | 11655889 | 0      | 276                |

|                     |          |          |          |          |      |     |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|------|-----|
| Réplica 1 (90 min)  | 228488   | 228063   | 228188   | 228246   | 0,09 | 26  |
| Réplica 2 (90 min)  | 186725   | 185930   | 185374   | 186009   | 0,36 | 25  |
| Réplica 3 (90 min)  | 219432   | 219496   | 220196   | 219708   | 0,19 | 26  |
| CA (90 min)         | 12274469 | 12275881 | 12285784 | 12278711 | 0,05 | 289 |
| Réplica 1 (105 min) | 179261   | 179064   | 179007   | 179110   | 0,07 | 25  |
| Réplica 2 (105 min) | 162924   | 162656   | 162754   | 162778   | 0,08 | 25  |
| Réplica 3 (105 min) | 139003   | 139666   | 139922   | 139530   | 0,33 | 24  |
| CA (105 min)        | 11963554 | 11968331 | 11970795 | 11967560 | 0,03 | 283 |
| Réplica 1 (120 min) | 129698   | 129644   | 129530   | 129624   | 0,06 | 24  |
| Réplica 2 (120 min) | 108537   | 108699   | 108336   | 108524   | 0,16 | 24  |
| Réplica 3 (120 min) | 102488   | 102514   | 103152   | 102718   | 0,36 | 24  |
| CA (120 min)        | 12264115 | 12266543 | 12271686 | 12267448 | 0,03 | 289 |
| Réplica 1 (180 min) | 68604    | 68822    | 68642    | 68689    | 0,16 | 23  |
| Réplica 2 (180 min) | 69639    | 69647    | 69740    | 69675    | 0,08 | 23  |
| Réplica 3 (180 min) | 50501    | 50631    | 50242    | 50458    | 0,39 | 22  |
| CA (180 min)        | 12733062 | 12748580 | 12742718 | 12741453 | 0,06 | 299 |

Fonte: Autoria própria. Controle abiótico (CA), desvio padrão (DP)

Dados da quantificação de 4VF no experimento de biotransformação da cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 em meio contendo glicose foi realizada com 3 injeções por amostras analisadas em comprimento de onda de 254 nm.

**APÊNDICE C - Tabela de valores obtidos na quantificação de 4VF durante a fermentação de 3 horas da cepa *Ochrobactrum intermedium* em MLM contendo glicose**

| Amostra<br>Nome    | Analito/ área          |                        |                        | Média   | DP (%) | mg L <sup>-1</sup> |
|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------|--------|--------------------|
|                    | 1 <sup>a</sup> injeção | 2 <sup>a</sup> injeção | 3 <sup>a</sup> injeção |         |        |                    |
| Réplica 1 (15 min) | 8048571                | 7830974                | 7792938                | 7890827 | 1,74   | 255                |
| Réplica 2 (15 min) | 7984518                | 7981114                | 7984723                | 7983451 | 0,02   | 258                |
| Réplica 3 (15 min) | 8068461                | 8069123                | 8020796                | 8052793 | 0,34   | 261                |
| CA (15 min)        | 0                      | 0                      | 0                      | 0       | 0      | 0                  |
| Réplica 1 (30 min) | 8108867                | 8107662                | 8206304                | 8140944 | 0,69   | 263                |
| Réplica 2 (30 min) | 8918146                | 8932555                | 8914507                | 8921736 | 0,1    | 288                |
| Réplica 3 (30 min) | 8973488                | 8967496                | 8963559                | 8968181 | 0,05   | 289                |
| CA (30 min)        | 0                      | 0                      | 0                      | 0       | 0      | 0                  |

|                     |         |         |         |         |      |     |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|------|-----|
| Réplica 1 (45 min)  | 8758784 | 8826371 | 8824989 | 8803381 | 0,43 | 284 |
| Réplica 2 (45 min)  | 9315005 | 9317390 | 9159150 | 9263848 | 0,97 | 299 |
| Réplica 3 (45 min)  | 9197628 | 9455492 | 9453005 | 9368708 | 1,58 | 302 |
| CA (45 min)         | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 (60 min)  | 8856299 | 8860372 | 8855013 | 8857228 | 0,03 | 286 |
| Réplica 2 (60 min)  | 8964044 | 9080693 | 9310314 | 9118350 | 1,93 | 294 |
| Réplica 3 (60 min)  | 9420624 | 9415419 | 9408601 | 9414881 | 0,06 | 304 |
| CA (60 min)         | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 (75 min)  | 8963679 | 8893092 | 8956006 | 8937592 | 0,43 | 288 |
| Réplica 2 (75 min)  | 9499135 | 9497244 | 9203383 | 9399920 | 1,81 | 303 |
| Réplica 3 (75 min)  | 9430079 | 9426027 | 9424386 | 9426830 | 0,03 | 304 |
| CA (75 min)         | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 (90 min)  | 9518574 | 9520368 | 9242176 | 9427039 | 1,69 | 304 |
| Réplica 2 (90 min)  | 9906915 | 9705931 | 9700239 | 9771028 | 1,2  | 315 |
| Réplica 3 (90 min)  | 9506546 | 9726650 | 9542870 | 9592022 | 1,23 | 309 |
| CA (90 min)         | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 (105 min) | 9052321 | 9054382 | 9044475 | 9050392 | 0,05 | 292 |
| Réplica 2 (105 min) | 9562126 | 9565625 | 9267409 | 9465053 | 1,8  | 305 |
| Réplica 3 (105 min) | 9615157 | 9665509 | 9652833 | 9644499 | 0,27 | 311 |
| CA (105 min)        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 (120 min) | 9089703 | 9372328 | 9276336 | 9246122 | 1,55 | 298 |
| Réplica 2 (120 min) | 9719112 | 9896458 | 9711456 | 9775675 | 1,07 | 315 |
| Réplica 3 (120 min) | 9851929 | 9846028 | 9842100 | 9846685 | 0,05 | 317 |
| CA (120 min)        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 (180 min) | 9673651 | 9574062 | 9668831 | 9638848 | 0,58 | 311 |
| Réplica 2 (180 min) | 9912357 | 9746528 | 9626465 | 9761783 | 1,47 | 315 |
| Réplica 3 (180 min) | 9560796 | 9569231 | 9551973 | 9560666 | 0,09 | 308 |
| CA (180 min)        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |

Fonte: Autoria própria

**APÊNDICE D - Dados de quantificação do ácido *p*-cumárico (CA) e 4-vinilfenol (4VF) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da cepa *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 em meio ausente de glicose**

A quantificação de AC no experimento de biotransformação da cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 em meio ausente de glicose foi realizada com 3 injeções por amostras analisadas em 303 nm.

**APÊNDICE E - Tabela de valores obtidos na quantificação de AC durante a fermentação de 3 horas da cepa *Ochrobactrum intermedium* em MLM ausente de glicose**

| Amostra<br>Nome     | Analito/ área          |                        |                        | Média    | DP (%) | mg L <sup>-1</sup> |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------|--------|--------------------|
|                     | 1 <sup>a</sup> injeção | 2 <sup>a</sup> injeção | 3 <sup>a</sup> injeção |          |        |                    |
| Réplica 1 (15 min)  | 5667312                | 5668716                | 5664637                | 5666888  | 0,03   | 145                |
| Réplica 2 (15 min)  | 6024387                | 6021526                | 6021814                | 6022575  | 0,02   | 153                |
| Réplica 3 (15 min)  | 5697552                | 5694872                | 5695661                | 5696028  | 0,02   | 146                |
| CA (15 min)         | 11445779               | 11463902               | 11456079               | 11455253 | 0,07   | 271                |
| Réplica 1 (30 min)  | 4162094                | 4162275                | 4159775                | 4161381  | 0,03   | 112                |
| Réplica 2 (30 min)  | 4392140                | 4390698                | 4391127                | 4391321  | 0,01   | 117                |
| Réplica 3 (30 min)  | 3769286                | 3768611                | 3768162                | 3768686  | 0,01   | 104                |
| CA (30 min)         | 11427828               | 11363876               | 11368474               | 11386726 | 0,31   | 270                |
| Réplica 1 (45 min)  | 3494466                | 3495872                | 3494085                | 3494807  | 0,02   | 98                 |
| Réplica 2 (45 min)  | 3303470                | 3303134                | 3302608                | 3303070  | 0,01   | 93                 |
| Réplica 3 (45 min)  | 2155320                | 2154806                | 2154022                | 2154716  | 0,03   | 68                 |
| CA (45 min)         | 11070500               | 11069131               | 11068919               | 11069516 | 0      | 263                |
| Réplica 1 (60 min)  | 2484765                | 2487244                | 2485952                | 2485987  | 0,04   | 76                 |
| Réplica 2 (60 min)  | 2115013                | 2114012                | 2113132                | 2114052  | 0,04   | 67                 |
| Réplica 3 (60 min)  | 2028876                | 2029105                | 2028036                | 2028672  | 0,02   | 66,                |
| CA (60 min)         | 10965677               | 10924704               | 10904719               | 10931700 | 0,28   | 260                |
| Réplica 1 (75 min)  | 2041131                | 2043788                | 2041999                | 2042306  | 0,06   | 66                 |
| Réplica 2 (75 min)  | 1632031                | 1631359                | 1631359                | 1631583  | 0,02   | 57                 |
| Réplica 3 (75 min)  | 1642689                | 1642766                | 1642428                | 1642627  | 0,01   | 57                 |
| CA (75 min)         | 11095245               | 11095095               | 11097859               | 11096066 | 0,01   | 264                |
| Réplica 1 (90 min)  | 1824066                | 1825645                | 1826928                | 1825546  | 0,07   | 61                 |
| Réplica 2 (90 min)  | 1524920                | 1526359                | 1525463                | 1525580  | 0,04   | 55                 |
| Réplica 3 (90 min)  | 1399839                | 1399079                | 1398817                | 1399245  | 0,03   | 52                 |
| CA (90 min)         | 11043721               | 11052666               | 11049924               | 11048770 | 0,04   | 263                |
| Réplica 1 (105 min) | 1444870                | 1445905                | 1445600                | 1445458  | 0,03   | 53                 |
| Réplica 2 (105 min) | 1337473                | 1337678                | 1337800                | 1337650  | 0,01   | 51                 |
| Réplica 3 (105 min) | 1105735                | 1106347                | 1106008                | 1106030  | 0,02   | 45                 |
| CA (105 min)        | 11094332               | 11094022               | 11088949               | 11092434 | 0,02   | 263                |
| Réplica 1 (120 min) | 1162363                | 1163718                | 1162587                | 1162889  | 0,06   | 47                 |
| Réplica 2 (120 min) | 995634                 | 995216                 | 995333                 | 995394   | 0,02   | 43                 |
| Réplica 3 (120 min) | 875651                 | 875403                 | 873584                 | 874879   | 0,12   | 40                 |
| CA (120 min)        | 11769689               | 11768395               | 11763581               | 11767221 | 0,02   | 278                |

|                     |          |          |          |          |      |     |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|------|-----|
| Réplica 1 (180 min) | 713777   | 713231   | 713031   | 713346   | 0,05 | 37  |
| Réplica 2 (180 min) | 578025   | 577826   | 578362   | 578071   | 0,04 | 34  |
| Réplica 3 (180 min) | 494794   | 495170   | 495321   | 495095   | 0,05 | 32  |
| CA (180 min)        | 10995551 | 10987741 | 10983037 | 10988776 | 0,05 | 261 |

Fonte: Autoria própria

A quantificação de 4VF no experimento de biotransformação da cepa bacteriana *Ochrobactrum intermedium* TG 3.48 em meio ausente de glicose foi realizada com 3 injeções por amostras analisadas em 254 nm.

**APÊNDICE F - Tabela de valores obtidos na quantificação de 4VF durante a fermentação de 3 horas da cepa *Ochrobactrum intermedium* em MLM ausente de glicose**

| Amostra   | Analito/ área |                        |                        | Média   | DP (%) | mg L <sup>-1</sup> |
|-----------|---------------|------------------------|------------------------|---------|--------|--------------------|
|           | Nome          | 1 <sup>a</sup> injeção | 2 <sup>a</sup> injeção |         |        |                    |
| Réplica 1 | 4404563       | 4408375                | 4400014                | 4404317 | 0,09   | 145                |
| Réplica 2 | 4496822       | 4244622                | 4492724                | 4411389 | 3,27   | 145                |
| Réplica 3 | 697347        | 4670970                | 4664400                | 3344239 | 4,31   | 112                |
| CA        | 0             | 0                      | 0                      | 0       | 0      | 0                  |
| Réplica 1 | 5175404       | 5460937                | 5464673                | 5367004 | 3,09   | 176                |
| Réplica 2 | 5751527       | 5740190                | 5743970                | 5745229 | 0,1    | 188                |
| Réplica 3 | 5787254       | 5781612                | 5776381                | 5781749 | 0,09   | 189                |
| CA        | 0             | 0                      | 0                      | 0       | 0      | 0                  |
| Réplica 1 | 6250312       | 6246846                | 6237595                | 6244917 | 0,1    | 203                |
| Réplica 2 | 6538740       | 6537333                | 6542410                | 6539494 | 0,04   | 213                |
| Réplica 3 | 7131930       | 7135535                | 7126830                | 7131431 | 0,06   | 231                |
| CA        | 0             | 0                      | 0                      | 0       | 0      | 0                  |
| Réplica 1 | 6811773       | 6704605                | 6698565                | 6738314 | 0,94   | 219                |
| Réplica 2 | 7385090       | 7382877                | 7379107                | 7382358 | 0,04   | 239                |
| Réplica 3 | 7489777       | 7487912                | 7204638                | 7394109 | 2,21   | 240                |
| CA        | 0             | 0                      | 0                      | 0       | 0      | 0                  |
| Réplica 1 | 6918090       | 6903616                | 6912119                | 6911275 | 0,1    | 224                |
| Réplica 2 | 7513289       | 7518567                | 7526415                | 7519423 | 0,08   | 244                |
| Réplica 3 | 7342450       | 7342232                | 7349387                | 7344689 | 0,05   | 238                |
| CA        | 0             | 0                      | 0                      | 0       | 0      | 0                  |

|           |         |         |         |         |      |     |
|-----------|---------|---------|---------|---------|------|-----|
| Réplica 1 | 7424541 | 7463946 | 7536776 | 7475087 | 0,76 | 242 |
| Réplica 2 | 7611489 | 7611816 | 7562797 | 7595367 | 0,37 | 246 |
| Réplica 3 | 7864949 | 7766104 | 7870439 | 7833830 | 0,74 | 254 |
| CA        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 | 7531756 | 7355570 | 7525396 | 7470907 | 1,33 | 242 |
| Réplica 2 | 7826279 | 7928772 | 7930896 | 7895315 | 0,75 | 256 |
| Réplica 3 | 8019561 | 7896639 | 7999787 | 7971995 | 0,82 | 258 |
| CA        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 | 7836890 | 7856783 | 7812070 | 7835247 | 0,28 | 254 |
| Réplica 2 | 8167236 | 8286547 | 8165852 | 8206545 | 0,84 | 265 |
| Réplica 3 | 8330137 | 8329915 | 8333317 | 8331123 | 0,02 | 269 |
| CA        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |
| Réplica 1 | 8326528 | 8313987 | 8317035 | 8319183 | 0,07 | 269 |
| Réplica 2 | 8434420 | 8220616 | 8435300 | 8363445 | 1,47 | 270 |
| Réplica 3 | 8558851 | 8551218 | 8553596 | 8554555 | 0,04 | 276 |
| CA        | 0       | 0       | 0       | 0       | 0    | 0   |

**Fonte:** Autoria própria

**APÊNDICE G - Concentrações de ácido *p*-cumárico (CA) e 4-vinilfenol (4VF) da curva de calibração em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

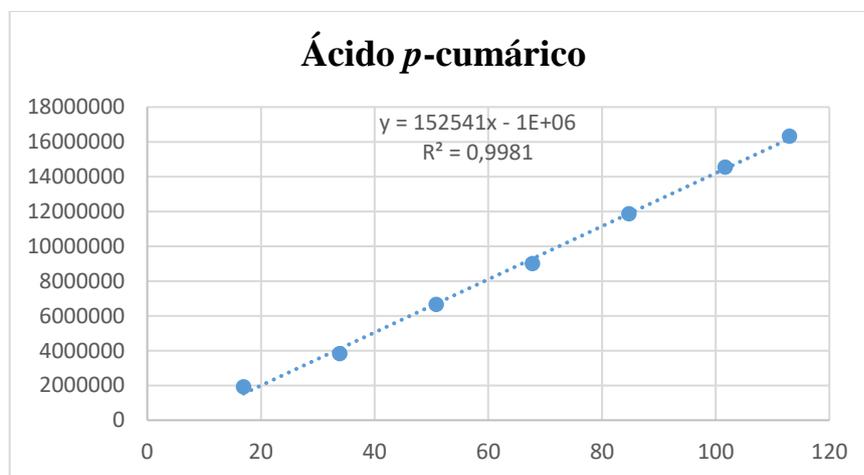
A quantificação do reagente grau analítico AC foi realizada com 3 injeções por amostras analisadas em 303 nm, seus valores obtidos são apresentados na tabela abaixo, representados no gráfico subsequente.

**APÊNDICE H - Tabela de valores obtidos na curva de calibração de AC usadas para quantificação nas fermentações de 3 horas da cepa *Ochrobactrum intermedium* em MLM**

| Amostra | Analito/ área                       |                        |                        |                        |       |
|---------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
|         | Corespondente (mg L <sup>-1</sup> ) | 1 <sup>a</sup> injeção | 2 <sup>a</sup> injeção | 3 <sup>a</sup> injeção | Média |
| 16,95   | 1917945                             | 1914380                | 1916123                | 1916149                | 0,09  |
| 33,9    | 3832040                             | 3828879                | 3827137                | 3829352                | 0,06  |
| 50,85   | 6693797                             | 6645121                | 6650301                | 6663073                | 0,4   |
| 67,8    | 9013142                             | 9005176                | 9008508                | 9008942                | 0,04  |
| 84,75   | 11843894                            | 11861831               | 11872628               | 11859451               | 0,12  |
| 101,7   | 14581426                            | 14539173               | 14539003               | 14553201               | 0,16  |
| 113     | 16314179                            | 16326547               | 16320216               | 16320314               | 0,03  |

Fonte: Autoria própria

**APÊNDICE I - Gráfico da curva de calibração do AC**



Fonte: Autoria própria

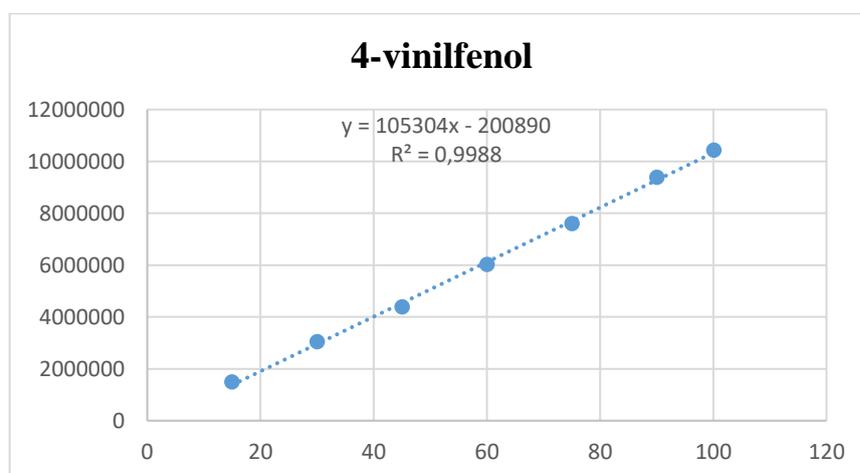
A quantificação do reagente grau analítico 4VF foi realizada com 3 injeções por amostras analisadas em 254 nm, seus valores obtidos são apresentados na tabela abaixo, representados no gráfico subsequente.

**APÊNDICE J - Tabela de valores obtidos na curva de calibração de 4FV usadas para quantificação nas fermentações de 3 horas da cepa *Ochrobactrum intermedium* em MLM**

| Amostra<br>Correspondente (mg L <sup>-1</sup> ) | Analito/ área          |                        |                        | Média    | DP (%) |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|----------|--------|
|   | 1 <sup>a</sup> injeção | 2 <sup>a</sup> injeção | 3 <sup>a</sup> injeção |          |        |
| 15,015  | 1573703                | 1442341                | 1446148                | 1487397  | 5,02   |
| 30,03   | 3036926                | 3036479                | 3038743                | 3037383  | 0,03   |
| 45,045  | 4450723                | 4274080                | 4445671                | 4390158  | 2,29   |
| 60,06   | 6051897                | 5941568                | 6063138                | 6018868  | 1,16   |
| 75,075  | 7556131                | 7541930                | 7679492                | 7592518  | 0,99   |
| 90,09   | 9367984                | 9394098                | 9380141                | 9380741  | 0,13   |
| 100,1   | 10443727               | 10424026               | 10426425               | 10431393 | 0,1    |

Fonte: Autoria própria

**APÊNDICE K - Gráfico da curva de calibração do 4VF**



Fonte: Autoria própria

**APÊNDICE L - Concentrações de glicose da curva de calibração em espectrofotômetro de UV-Vis**

A quantificação de glicose usada na curva de calibração foi feita pela reação de DNS realizada no termociclador, aquecido a 95 °C por 15 minutos e posteriormente resfriada a 4 °C por 2 minutos, após a reação as soluções foram colocadas em placa 96 poços e diluídas caso a

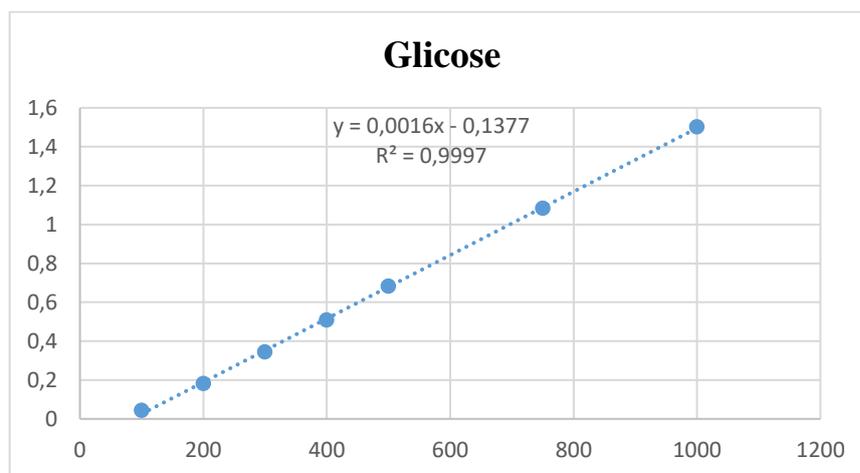
leitura ultrapassasse absorvância igual ou superior a 1,0 em DO 540 nm no espectrofotômetro, seus valores obtidos são apresentados na tabela abaixo, representados gráfico subsequente.

**APÊNDICE M - Tabela de valores obtidos na curva de calibração de glicose usados para quantificação na fermentação de 3 horas da cepa *Ochrobactrum intermedium* em MLM contendo glicose**

| Amostra<br>Correspondente (mg L <sup>-1</sup> ) | Analito/ DO540 <sub>nm</sub> |                        |                        | Média | DP (%) |
|---|------------------------------|------------------------|------------------------|-------|--------|
|   | 1 <sup>a</sup> leitura       | 2 <sup>a</sup> leitura | 3 <sup>a</sup> leitura |       |        |
| 0   | 0                            | 0                      | 0                      | 0     | 6,97   |
| 100   | 0,043                        | 0,046                  | 0,04                   | 0,04  | 5,09   |
| 200   | 0,176                        | 0,192                  | 0,176                  | 0,18  | 2,05   |
| 300   | 0,339                        | 0,353                  | 0,344                  | 0,34  | 3,01   |
| 400   | 0,526                        | 0,499                  | 0,5                    | 0,5   | 2,05   |
| 500   | 0,687                        | 0,694                  | 0,667                  | 0,68  | 1,47   |
| 750   | 1,1                          | 1,084                  | 1,068                  | 1,08  | 4,66   |
| 1000  | 1,582                        | 1,452                  | 1,472                  | 1,50  | 6,97   |

Fonte: Autoria própria

**APÊNDICE N - Gráfico da curva de calibração da glicose**



Fonte: Autoria própria