

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 07/08/2027

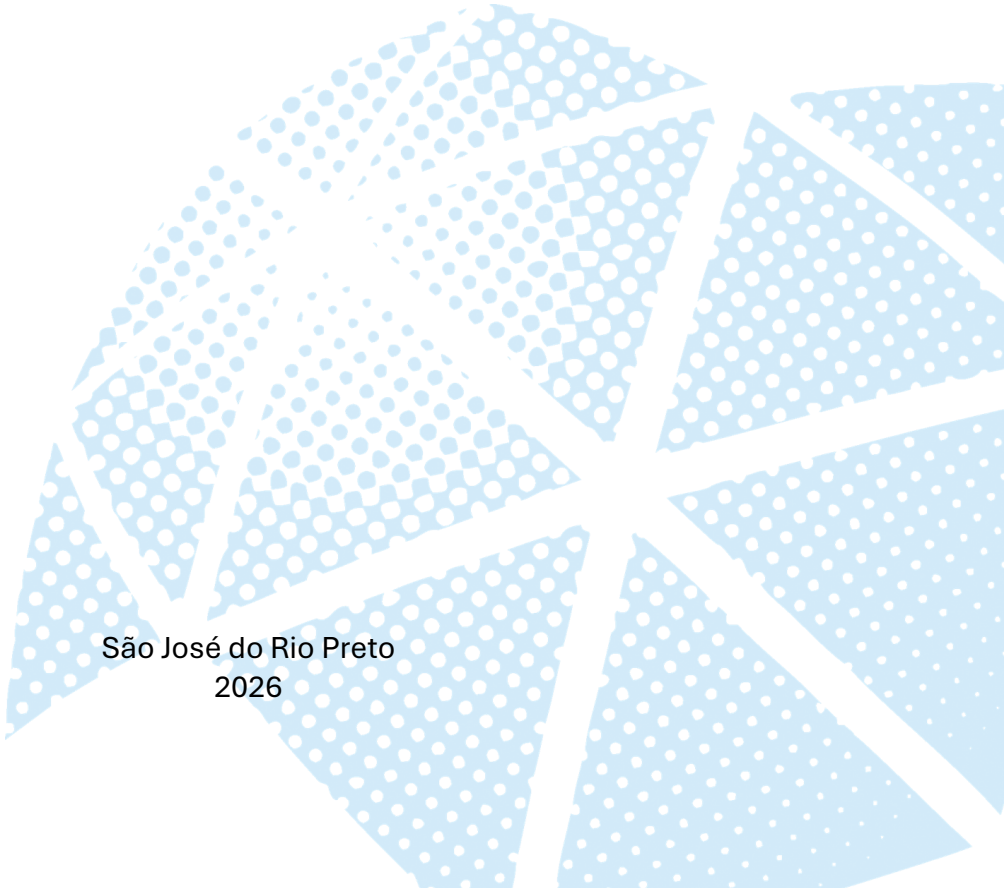
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Campus de São José do Rio
Preto

LARA MARIA BIANCHETI

BIOTRANSFORMAÇÃO DE ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS POR *Micrococcus luteus*
TG3.30

Uma abordagem bioquímica, genômica e *in silico*

São José do Rio Preto
2026



LARA MARIA BIANCHETI

Biotransformação de ácidos hidroxicinâmicos por *Micrococcus luteus* TG3.30

Uma abordagem bioquímica, genômica e *in silico*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eleni Gomes

Coorientadora: Dra. Nathália Vilela

Coorientadora: Dra. Maitê Bernardo Correia dos Santos

São José do Rio Preto

2026

B577b Bianchetti, Lara
Biotransformação de ácidos hidroxicinâmicos por *Micrococcus luteus* TG3.30 : Uma abordagem bioquímica, genômica e in silico / Lara Bianchetti. -- São José do Rio Preto, 2026
141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Eleni Gomes
Coorientadora: Nathália Vilela

1. Microbiologia Industrial. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Ácido ferúlico. 4. 4-vinilguaicol. 5. Biotransformação. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta tese contribui para a bioeconomia circular ao demonstrar uma rota biotecnológica para converter ácido ferúlico de biomassa lignocelulósica em 4-vinilguaiacol, ampliando o uso de resíduos agroindustriais e revelando uma possível via enzimática não canônica em *Micrococcus luteus* TG3.30.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This thesis contributes to the circular bioeconomy by demonstrating a biotechnological route to convert lignocellulosic ferulic acid into 4-vinylguaiacol, expanding agro-industrial waste valorization and revealing a potential non-canonical enzymatic pathway in *Micrococcus luteus* TG3.30.

LARA MARIA BIANCHETI

Biotransformação de ácidos hidroxicinâmicos por *Micrococcus luteus* TG3.30

Uma abordagem bioquímica, genômica e *in silico*

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Data da defesa: 07/08/2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eleni Gomes

UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Prof. Dr. Jeferson Gross

UNESP – Rio Claro

Dra. Leticia Maria Zanphorlin Murakami

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM

Prof. Dr. Icaro Putinhon Caruso

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Henrique Ferreira

UNESP – Rio Claro

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

UFSCAR – Araras

“We must have perseverance and above all confidence in ourselves.”
Marie Curie

Agradecimentos

À Deus, que plantou esse sonho em meu coração e me sustentou durante todo o processo, muito obrigada.

Agradeço aos meus pais por nunca me deixarem duvidar de minha capacidade, potencial e coragem. Por me fortalecerem todos os dias e me permitirem viver o Doutorado integralmente, me dedicando de forma completa.

Ao meu irmão, Lorenzo, por tornar esses anos leves, divertidos e cheios de amor. Obrigada por ser presença constante, por me lembrar da vida para além da pesquisa e por trazer alegria mesmo nos dias mais cansativos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eleni Gomes, agradeço imensamente pela orientação, confiança, incentivo e por todas as oportunidades proporcionadas ao longo desta trajetória. Obrigada por acreditar no meu trabalho, por contribuir para minha formação científica e por me acompanhar durante os desafios e conquistas deste doutorado.

Às minhas coorientadoras, Dra. Maite e Dra. Nathalia, agradeço pelas contribuições, disponibilidade, apoio e pelas discussões que enriqueceram este trabalho. Cada sugestão, orientação e troca de conhecimento foi essencial para a construção desta tese.

À Profa. Dra. Lisbeth Olsson, minha supervisora durante o período de doutorado sanduíche na Suécia, agradeço a oportunidade, acolhimento e orientação durante minha experiência na Chalmers University of Technology. Esse período foi muito importante para meu crescimento científico, profissional e pessoal, e levarei comigo os aprendizados adquiridos nessa etapa tão especial da minha formação.

Ao Raphael, parceiro nos experimentos *in silico*, agradeço a colaboração, disponibilidade e pelas contribuições técnicas ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelas discussões, pela parceria e pelo comprometimento nesta etapa da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, Érike, Anas, Rafael, Manu, Antonio e tantos outros, agradeço a convivência, parceria, ajuda e amizade ao longo desses anos. Obrigada por compartilharem comigo a rotina da pesquisa, os desafios dos experimentos, as conversas, os cafés, as risadas e também os momentos de incerteza. A presença de vocês tornou essa caminhada mais leve e significativa.

Às minhas alunas de iniciação científica e amigas, Giovana, Ana Luiza e Camila, agradeço a dedicação, responsabilidade, curiosidade científica e carinho. Foi uma alegria acompanhar o crescimento de vocês e compartilhar não apenas experimentos e resultados, mas também amizade, aprendizado e companheirismo. Obrigada por fazerem parte desta trajetória de forma tão especial.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela formação acadêmica, pela estrutura e pelas oportunidades oferecidas durante minha trajetória. À Chalmers University of Technology, agradeço pela oportunidade de desenvolver parte desta pesquisa em um ambiente científico internacional, colaborativo e enriquecedor.

Ao meu namorado, Eduardo, agradeço pelo apoio, carinho e paciência, especialmente nos meses que antecederam a defesa desta tese. Sua presença, incentivo e compreensão foram fundamentais para que eu atravessasse esse período com mais leveza, confiança e serenidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos nº 19/20825-0, 21/01317-4 e 24/06046-7), ao Conselho de Pesquisa Sueco (Número de Projeto: 29230079) e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE; Processo nº 88881.982022/2024-01), agradeço pelo apoio financeiro e institucional, fundamentais para a realização deste doutorado e para o desenvolvimento das atividades de pesquisa no Brasil e no exterior.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta caminhada. Cada palavra de incentivo, cada gesto de apoio, cada colaboração e cada presença contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. Esta tese representa não apenas anos de estudo, trabalho e persistência, mas também o resultado de muitas pessoas que caminharam comigo até aqui.

RESUMO

A valorização de compostos fenólicos derivados da biomassa lignocelulósica representa uma estratégia relevante para o desenvolvimento de processos sustentáveis associados à bioeconomia circular. Entre esses compostos, o ácido ferúlico destaca-se como precursor renovável para a produção de 4-vinilguaiaicol (4VG), molécula aromática de interesse para as indústrias de alimentos, fragrâncias, cosméticos e química fina. Esta tese investigou a capacidade de *Micrococcus luteus* TG3.30 em converter ácido ferúlico em 4VG, integrando caracterização bioquímica, aplicação em hidrolisado fúngico, análise genômica, proteômica e modelagem *in silico*. Inicialmente, foi realizada uma revisão crítica sobre compostos fenólicos derivados da lignina e suas aplicações tecnológicas. Em seguida, extratos enzimáticos de *M. luteus* TG3.30 foram obtidos e avaliados quanto à atividade descarboxilante sobre ácido ferúlico comercial, considerando diferentes frações celulares, tempos de reação e pH. A atividade foi predominantemente associada ao extrato intracelular, sendo 60 min e pH 6,5 definidos como condições adequadas para os ensaios. Posteriormente, hidrolisados fúngicos obtidos por fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo com *Myceliophthora heterothallica* e *Myceliophthora thermophila* foram utilizados como substratos para a conversão enzimática. Ambos os hidrolisados de 8 dias permitiram a formação de 4VG pelo extrato intracelular de *M. luteus* TG3.30, atingindo 49,67 mg L⁻¹ para *M. heterothallica* e 51,91 mg L⁻¹ para *M. thermophila*. O sequenciamento completo do genoma de *M. luteus* TG3.30 revelou um genoma de 2,58 Mb, com 72,92% de conteúdo GC, mas não identificou genes codificantes para ferulato descarboxilases canônicas. Diante disso, foram investigadas enzimas alternativas com atividade descarboxilase anotada ou domínios relacionados, incluindo *hemQ*, *sucA*, *pyrF* e *panD*. Análises proteômicas por LC-MS/MS e modelagem molecular indicaram a coproheme descarboxilase, codificada por *hemQ*, como candidata prioritária para a atividade observada. As predições *in silico* indicaram afinidade da enzima pelo ácido *trans*-ferúlico e sugeriram a participação de resíduos como His163, Tyr140, Trp188 e Phe142 na estabilização do substrato. Em conjunto, os resultados demonstram que *M. luteus* TG3.30 é capaz de converter ácido ferúlico em 4VG por um sistema enzimático intracelular, possivelmente associado a uma rota não canônica de descarboxilação. Esta tese contribui para ampliar o conhecimento sobre a biotransformação de ácidos fenólicos por actinobactérias ambientais e propõe uma abordagem integrada para valorização de resíduos lignocelulósicos e produção sustentável de compostos aromáticos de maior valor agregado.

Palavras-chave: *Micrococcus luteus* TG3.30; ácido ferúlico; 4-vinilguaiaicol; biomassa lignocelulósica; coproheme descarboxilase; biotransformação.

ABSTRACT

The valorization of phenolic compounds derived from lignocellulosic biomass represents an important strategy for the development of sustainable processes aligned with the circular bioeconomy. Among these compounds, ferulic acid stands out as a renewable precursor to produce 4-vinylguaiacol (4VG), an aromatic molecule of interest to the food, fragrance, cosmetic, and fine chemical industries. This thesis investigated the ability of *Micrococcus luteus* TG3.30 to convert ferulic acid into 4VG by integrating biochemical characterization, application in fungal hydrolysates, genomic analysis, proteomics, and *silico* modeling. Initially, a critical review was conducted on lignin-derived phenolic compounds and their technological applications. Subsequently, enzymatic extracts from *M. luteus* TG3.30 were obtained and evaluated for decarboxylating activity against commercial ferulic acid, considering different cellular fractions, reaction times, and pH conditions. The activity was mainly associated with the intracellular extract, and 60 min at pH 6.5 were selected as suitable conditions for the assays. Fungal hydrolysates obtained by solid-state fermentation of sugarcane bagasse and wheat bran with *Myceliophthora heterothallica* and *Myceliophthora thermophila* were then used as substrates for enzymatic conversion. Both 8-day hydrolysates supported 4VG formation by the intracellular extract of *M. luteus* TG3.30, reaching 49.67 mg L⁻¹ for *M. heterothallica* and 51.91 mg L⁻¹ for *M. thermophila*. Whole-genome sequencing of *M. luteus* TG3.30 revealed a 2.58 Mb genome with 72.92% GC content, but no genes encoding canonical ferulic acid decarboxylases were identified. Therefore, alternative enzymes annotated as decarboxylases or containing related domains were investigated, including *hemQ*, *sucA*, *pyrF*, and *panD*. LC-MS/MS-based proteomic analysis and molecular modeling indicated coproheme decarboxylase, encoded by *hemQ*, as the main candidate associated with the observed activity. *In silico* predictions suggested affinity between this enzyme and *trans*-ferulic acid and indicated the possible involvement of residues such as His163, Tyr140, Trp188, and Phe142 in substrate stabilization. Overall, the results demonstrate that *M. luteus* TG3.30 can convert ferulic acid into 4VG through an intracellular enzymatic system, possibly associated with a non-canonical decarboxylation route. This thesis expands the understanding of phenolic acid biotransformation by environmental actinobacteria and proposes an integrated approach for lignocellulosic waste valorization and sustainable production of high-value aromatic compounds.

Keywords: *Micrococcus luteus* TG3.30; ferulic acid; 4-vinylguaiacol; lignocellulosic biomass; coproheme decarboxylase; biotransformation.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. GERAIS	5
2.2. ESPECÍFICOS.....	5
REFERÊNCIAS	7
3. PHENOLIC COMPOUNDS DERIVED FROM PLANT METABOLISM AND LIGNIN: BIOTRANSFORMATION AND TECHNOLOGICAL APPLICATIONS	10
4. BIOTRANSFORMAÇÃO DE ÁCIDO <i>t</i> -FERÚLICO POR <i>Micrococcus luteus</i> TG3.30: CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS.....	31
5. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HIDRÓLISE FÚNGICA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E SUA SUBSEQUENTE BIOTRANSFORMAÇÃO POR EXTRATO ENZIMÁTICO DE <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i> TG3.30.....	57
6. WHOLE-GENOME SEQUENCING AND ANNOTATION OF <i>Micrococcus luteus</i> TG3.30 ISOLATED FROM SUGARCANE PLANTATION SOIL IN SÃO PAULO, BRAZIL ...	82
7. ABORDAGEM GENÔMICA, PROTEÔMICA E <i>IN SILICO</i> NA IDENTIFICAÇÃO DE UMA ROTA CATALÍTICA ATÍPICA PARA CONVERSÃO DE ÁCIDO FERÚLICO EM <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i> TG3.30.....	94
8. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	108

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA CIENTÍFICA

Diversos microrganismos apresentam capacidade de transformar compostos fenólicos derivados da lignina. Entre esses compostos, os ácidos hidroxicinâmicos apresentam grande relevância biotecnológica. O ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico são encontrados em diferentes biomassas vegetais, geralmente associados à hemicelulose e à lignina por ligações éster. O ácido ferúlico, especialmente abundante em gramíneas e resíduos agrícolas, tem recebido destaque por, além das diversas aplicações em sua forma nativa, poder ser precursor de moléculas aromáticas de alto valor agregado. Sua liberação a partir de resíduos lignocelulósicos cria oportunidades para a obtenção de matéria prima abundante e de baixo custo na produção de biocompostos aplicáveis aos setores de alimentos, fragrâncias, cosméticos, polímeros e química fina (BASAFA; HAWBOLDT, 2023; DE LA ROSA et al., 2018; SALTVEIT, 2018; SUN et al., 2021).

Bactérias, leveduras e fungos podem atuar na liberação desses compostos a partir da biomassa lignocelulósica, na sua modificação ou conversão a derivados importantes por meio de sistemas enzimáticos específicos (DE CARVALHO et al., 2025; SANTOS, 2023). Entre as enzimas envolvidas nesse tipo de metabolismo, destacam-se descarboxilases de ácidos fenólicos, ferulato descarboxilases, oxidases, redutases, esterases e monooxigenases. A eficiência dessas rotas depende de fatores como origem do microrganismo, disponibilidade do substrato, tolerância aos compostos fenólicos, localização celular da atividade enzimática e condições físico-químicas da reação.

A conversão do ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol (4VG) representa uma rota de interesse dentro desse contexto. O 4VG é um fenol volátil caracterizado por aroma semelhante ao cravo, com aplicações como flavorizante e intermediário químico (LUO et al., 2021). Essa molécula pode ser obtida por descarboxilação do ácido ferúlico, reação na qual ocorre remoção do grupo carboxila da cadeia lateral do ácido hidroxicinâmico e formação do derivado vinílico correspondente (VILELA et al., 2025). A realização dessa transformação por microrganismos ou enzimas oferece uma alternativa mais seletiva e potencialmente mais sustentável em comparação a processos químicos convencionais, além da certificação como produto natural.

Apesar do avanço no estudo de descarboxilases capazes de converter ácido ferúlico em 4VG, ainda há limitações importantes para aplicação desses sistemas em bioprocessos. Muitos estudos utilizam ácido ferúlico comercial como substrato modelo, condição útil para caracterização inicial, mas com custo elevado. A alternativa do uso desses compostos oriundas da biomassa lignocelulósica encontra obstáculo na complexidade dos hidrolisados derivados da biomassa. Estes hidrolisados lignocelulósicos podem conter resíduos de açúcares e proteínas e vários tipos compostos fenólicos derivados da lignina que podem interferir na atividade microbiana do de suas enzimas. Dessa forma, avaliar a conversão de ácido ferúlico em matrizes complexas é essencial para aproximar a reação de uma aplicação biotecnológica real, a partir de matéria prima renovável e de baixo custo.

Além dessas questões, a compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na biotransformação de compostos fenólicos é fundamental para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas. A integração entre sequenciamento genômico, prospecção gênica, análise proteômica e modelagem *in silico* permite investigar enzimas candidatas, avaliar possíveis rotas metabólicas e propor hipóteses para reações de interesse. Essa abordagem é especialmente relevante quando uma atividade enzimática observada não pode ser imediatamente atribuída a enzimas canônicas já descritas na literatura.

Nesse cenário, linhagens bacterianas nativas associadas a ambientes com presença de resíduos de material vegetal constituem fontes promissoras para esses estudos. Esses ambientes são ricos em matéria orgânica vegetal e submetem os microrganismos a uma ampla diversidade de compostos aromáticos derivados da decomposição da biomassa. Assim, bactérias isoladas desses sistemas podem apresentar repertórios metabólicos adaptados à transformação de compostos fenólicos, incluindo vias ainda pouco exploradas para valorização de ácidos hidroxicinâmicos.

Dessa forma, esta tese se justifica pela necessidade de investigar sistemas microbianos capazes de converter ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol e de compreender os mecanismos bioquímicos, genéticos e estruturais associados a essa biotransformação. A abordagem proposta integra a caracterização enzimática de *Micrococcus luteus* TG3.30, a aplicação da atividade em hidrolisados fúngicos derivados

de biomassa lignocelulósica e a análise molecular de possíveis enzimas envolvidas. Com isso, busca-se contribuir para o desenvolvimento de rotas sustentáveis de valorização de resíduos agroindustriais e para a ampliação do repertório de biocatalisadores aplicáveis à produção de compostos aromáticos renováveis.

REFERÊNCIAS

BASAFA, Mahsan; HAWBOLDT, Kelly. A review on sources and extraction of phenolic compounds as precursors for bio-based phenolic resins. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 4463–4475, 2023. DOI: 10.1007/s13399-021-01408-x.

BELLUATI, Marco; TABASSO, Silvia; CALCIO GAUDINO, Emanuela; CRAVOTTO, Giancarlo; MANZOLI, Maela. Biomass-derived carbon-based catalysts for lignocellulosic biomass and waste valorisation: a circular approach. **Green Chemistry**, [S. l.], 2024. DOI: 10.1039/d4gc00606b.

BIANCHETI, Lara Maria; ZAITER, Mohammed Anas; PEREIRA, Erike Jhonnathan; DE LEMOS, Eliana Gertrudes Macedo; BOSCOLO, Maurício; DA SILVA, Roberto; METZKER, Gustavo; GOMES, Eleni. Phenolic Compounds Derived from Plant Metabolism and Lignin: Biotransformation and Technological Applications. **Waste and Biomass Valorization**, [S. l.], 2026. DOI: 10.1007/s12649-026-03581-4.

DE CARVALHO, Sylvia Patricia; ZAITER, Mohammed Anas; DANTAS, Karine Sousa; PEREIRA, Érike Jhonnathan; DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues; BOSCOLO, Maurício; DA SILVA, Roberto; DOS SANTOS, Maitê Bernardo Correia; GOMES, Eleni. Bioconversion of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol by Ferulic Acid Decarboxylase from *Brucella intermedia* TG 3.48. **Processes**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 3367, 2025. DOI: 10.3390/pr13103367.

DE LA ROSA, Laura A.; MORENO-ESCAMILLA, Jesús Omar; RODRIGO-GARCÍA, Joaquín; ALVAREZ-PARRILLA, Emilio. Phenolic compounds. *Em: Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. p. 253–271. DOI: 10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>.

EMMANUEL, Okezie; ROZINA; EZEJI, Thaddeus C. Utilization of biomass-based resources for biofuel production: A mitigating approach towards zero emission. **Sustainable Chemistry One World**, [S. l.], v. 2, p. 100007, 2024. DOI: 10.1016/j.scowo.2024.100007.

LUO, Yun; WANG, Chong Zhi; SAWADOGO, Richard; YUAN, Jinbin; ZENG, Jinxiang; XU, Ming; TAN, Ting; YUAN, Chun Su. 4-Vinylguaiacol, an Active Metabolite of Ferulic Acid by

Enteric Microbiota and Probiotics, Possesses Significant Activities against Drug-Resistant Human Colorectal Cancer Cells. **ACS omega**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 4551–4561, 2021. DOI: 10.1021/ACSOMEGA.0C04394. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33644563/>. Acesso em: 6 fev. 2022.

MARSHALL, Stephen A.; PAYNE, Karl A. P.; FISHER, Karl; TITCHINER, Gabriel R.; LEVY, Colin; HAY, Sam; LEYS, David. UbiD domain dynamics underpins aromatic decarboxylation. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 5065, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-25278-z.

MARTÍNKOVÁ, Ludmila; GRULICH, Michal; PÁTEK, Miroslav; KŘÍSTKOVÁ, Barbora; WINKLER, Margit. Bio-Based Valorization of Lignin-Derived Phenolic Compounds: A Review. **Biomolecules**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 717, 2023. DOI: 10.3390/biom13050717.

MENEZES, Fabricia F.; NASCIMENTO, Viviane M.; GOMES, Gustavo R.; ROCHA, George J. M.; STRAUSS, Mathias; JUNQUEIRA, Tassia L.; DRIEMEIER, Carlos. Depolymerization of enzymatic hydrolysis lignin: Review of technologies and opportunities for research. **Fuel**, [S. l.], v. 342, n. January, p. 127796, 2023. DOI: 10.1016/j.fuel.2023.127796. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127796>.

MURILLO-FRANCO, Sarha Lucia; DOS SANTOS DE VECHI, Carla V.; BIANCHETI, Lara Maria; MILESSI, Thais S.; ARRUDA, Priscila V.; SANTOS, Erica Daniely; DA SILVA, Debora D. Virginio; DUSSÁN, Kelly Johana. Detoxification Strategies to Remove Inhibitors from Lignocellulose Hydrolysates: Challenges and New Prospects. *Em*: [s.l.: s.n.]. p. 229–269. DOI: 10.1007/978-981-95-3913-0_10.

SALTVEIT, Mikal E. Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. *Em*: YAHIA, Elhadi M. (org.). **Fruit and Vegetable Phytochemicals: chemistry and Human Health**. Second ed. [s.l.] : John Wiley & Sons Ltd., 2018. v. 1p. 115–123.

SANTOS, Maitê Bernardo Correia Dos. **Produção de ácido ferúlico usando descarboxilase heteróloga de *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 e aplicação da enzima na produção de 4-vinilguaiaicol**. 2023. Ibilce, Unesp, São José do Rio Preto, 2023.

SUN, Xinxiao; LI, Xianglai; SHEN, Xiaolin; WANG, Jia; YUAN, Qipeng. Recent advances in microbial production of phenolic compounds. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 30, p. 54–61, 2021. a. DOI: 10.1016/j.cjche.2020.09.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.09.001>.

VILELA, Nathália et al. From residues to clove: Harnessing novel phenolic acid decarboxylase for 4-Vinyl guaiacol production in industrial Yeast. **Food and Bioprocess Processing**, [S. l.], v. 151, p. 20–27, 2025. DOI: 10.1016/j.fbp.2025.02.013.

8. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta tese demonstrou a viabilidade de uma abordagem integrada para a valorização biotecnológica do ácido ferúlico, conectando a obtenção de compostos fenólicos a partir da biomassa lignocelulósica à sua conversão enzimática em 4-vinilguaicol (4VG). Os resultados indicam que *Micrococcus luteus* TG3.30 apresenta atividade descarboxilante intracelular capaz de converter ácido ferúlico em 4VG, tanto em condição modelo, utilizando substrato comercial, quanto em matriz complexa derivada de hidrolisado fúngico.

O Capítulo I estabeleceu a base conceitual do trabalho ao discutir os compostos fenólicos derivados da lignina e do metabolismo vegetal, destacando seu potencial como matérias-primas renováveis para obtenção de moléculas de maior valor agregado. Essa revisão sustentou a escolha do ácido ferúlico como substrato-alvo, considerando sua ocorrência em biomassas lignocelulósicas e sua possibilidade de conversão em 4VG, composto de interesse para as indústrias de alimentos, fragrâncias, cosméticos e química fina.

No Capítulo II, foi comprovada a capacidade de *M. luteus* TG3.30 em converter ácido ferúlico comercial em 4VG por meio de um sistema enzimático predominantemente intracelular. A fração intracelular apresentou melhor desempenho em comparação às frações extracelular e de parede celular, e as condições de 60 min de reação e pH 6,5 foram definidas como adequadas para avaliação da atividade. Esses resultados estabeleceram a base bioquímica da tese e demonstraram o fenótipo de descarboxilação da linhagem.

O Capítulo III ampliou essa abordagem para uma matriz real derivada de biomassa. Os fungos termofílicos *Myceliophthora heterothallica* e *Myceliophthora thermophila* foram capazes de crescer em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, promovendo consumo da biomassa e liberação de açúcares, proteínas e compostos fenólicos totais. Os hidrolisados fúngicos de 8 dias, quando incubados com o extrato intracelular de *M. luteus* TG3.30, resultaram na formação de 4VG, atingindo 51,91 mg L⁻¹ para *M. thermophila* e 49,67 mg L⁻¹ para *M.*

heterothallica. Esse resultado demonstrou que a atividade observada em substrato puro também ocorre em matriz lignocelulósica complexa.

No Capítulo IV, o sequenciamento e a anotação do genoma de *M. luteus* TG3.30 permitiram investigar a base genética associada à atividade observada. O genoma apresentou 2,58 Mb, elevado conteúdo GC e alta completude. No entanto, não foram identificados genes codificantes para ferulato descarboxilases canônicas, estabelecendo um contraste entre o fenótipo experimental e o genótipo esperado. Essa ausência direcionou a investigação para enzimas alternativas anotadas como descarboxilases ou contendo domínios relacionados a reações de descarboxilação.

O Capítulo V integrou os dados bioquímicos, genômicos, proteômicos e *in silico* para propor uma hipótese para a conversão atípica do ácido ferúlico em 4VG. Entre as enzimas candidatas, a coproheme descarboxilase, codificada por *hemQ*, destacou-se como a hipótese mais consistente. Essa enzima possui função primária relacionada à biossíntese de heme, catalisando a formação de grupos vinil a partir de cadeias laterais carboxiladas. As análises de modelagem molecular indicaram afinidade da enzima pelo ácido *trans*-ferúlico e sugeriram a participação de resíduos como His163, Tyr140, Trp188 e Phe142 na estabilização do substrato.

De forma integrada, os resultados indicam que a conversão de ácido ferúlico em 4VG por *M. luteus* TG3.30 provavelmente não ocorre por uma rota clássica mediada por ferulato descarboxilases canônicas da família UbiD. Em vez disso, os dados apontam para uma possível rota alternativa, baseada em uma enzima intracelular com função primária distinta e potencial atividade secundária sobre o ácido ferúlico. Essa hipótese amplia o entendimento sobre a diversidade de mecanismos enzimáticos envolvidos na descarboxilação de ácidos fenólicos em actinobactérias ambientais.

Assim, a principal contribuição desta tese foi demonstrar que *M. luteus* TG3.30 é uma linhagem promissora para a produção biotecnológica de 4VG a partir de ácido ferúlico e que essa atividade pode estar associada a uma via não canônica. Além disso, a integração entre hidrólise fúngica da biomassa, conversão bacteriana, genômica, proteômica e modelagem molecular apresentou uma rota sistêmica para valorização de resíduos lignocelulósicos.

Como perspectivas futuras, recomenda-se a validação experimental da enzima candidata por clonagem e expressão heteróloga de *hemQ*, purificação da proteína

recombinante e ensaios cinéticos com ácido ferúlico. Também será importante avaliar mutações nos resíduos indicados pelas análises *in silico*, especialmente His163, Tyr140, Trp188 e Phe142, a fim de confirmar sua participação no reconhecimento e na conversão do substrato. Essas etapas serão essenciais para confirmar a função proposta da coproheme descarboxilase e consolidar a existência de uma rota alternativa de produção de 4VG em *M. luteus* TG3.30.