

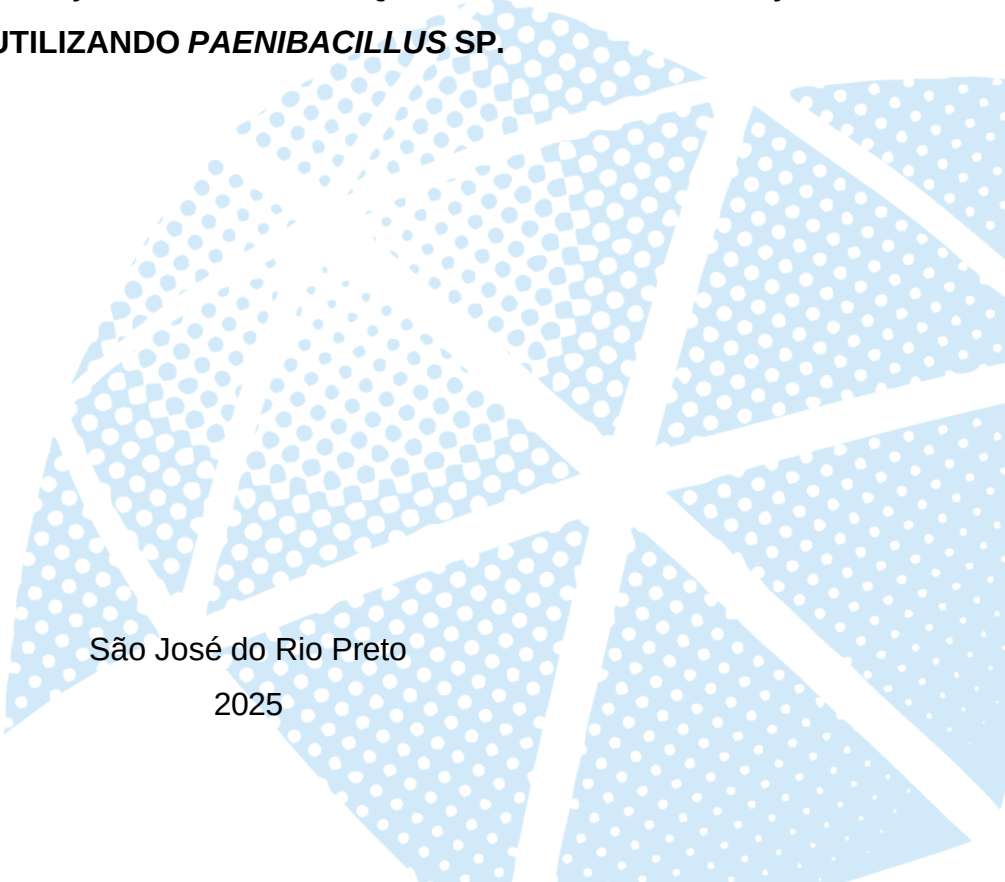
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- Campus de São José do Rio
Preto

ANNA CAROLINA DE OLIVEIRA SOUZA

PRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CHIQUÍMICO POR FERMENTAÇÃO
UTILIZANDO *PAENIBACILLUS* SP.

São José do Rio Preto

2025



ANNA CAROLINA DE OLIVEIRA SOUZA

**PRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CHIQUÍMICO POR FERMENTAÇÃO
UTILIZANDO *PAENIBACILLUS* SP**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador(a): Profa. Dra. Eleni Gomes

Coorientador(a): Profa. Dra. Eliana
Gertrudes de Macedo Lemos

São José do Rio Preto

2025

S729p

Souza, Anna Carolina de Oliveira

Produção e Identificação de Ácido Chiquímico por Fermentação Utilizando
Paenibacillus sp. / Anna Carolina de Oliveira Souza. -- , 2025
78 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto,

Orientadora: Eleni Gomes

Coorientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

1. Ácido chiquímico. 2. Via do chiquimato. 3. Biotecnologia.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Minha pesquisa tem impacto científico, tecnológico e social, promovendo inovações em microbiologia com aplicações na saúde, biotecnologia e meio ambiente. Contribui para o desenvolvimento sustentável, a formação de profissionais qualificados e a internacionalização da ciência. Além disso, fortalece a pesquisa local, regional e nacional, impulsionando a educação e a conscientização sobre a importância da microbiologia na sociedade.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

My research has scientific, technological, and social impacts, promoting innovations in microbiology with applications in health, biotechnology, and the environment. It contributes to sustainable development, the training of qualified professionals, and the internationalization of science. Additionally, it strengthens local, regional, and national research, enhancing education and awareness of the importance of microbiology in society.

ANNA CAROLINA DE OLIVEIRA SOUZA

**Produção e Identificação de Ácido Chiquímico por Fermentação Submersa utilizando
Paenibacillus sp.**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Data da defesa: 24/02/2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Câmpus de Jaboticabal
Coorientadora

Profa. Dra. Maísa Azevedo Beluomini,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Câmpus de Jaboticabal

Prof. Dr. Lucas William Mendes
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Tsai Siu Mui
Universidade de São Paulo

Dr. Cleiton Dias do Prado
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Câmpus de Jaboticabal

Dedico este trabalho à minha mãe, cuja atenção, compreensão e apoio incondicional foram fundamentais.

Sou imensamente grata por seu incentivo constante e por sempre estar ao meu lado, ouvindo-me e acreditando em mim.

AGRADECIMENTOS

Com imensa alegria, agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, Elisabete, pelo amor incondicional, apoio constante e fé inabalável no meu potencial; ao meu irmão, Caio, e ao meu namorado Murilo, que sempre estiveram ao meu lado, celebrando cada conquista e oferecendo amor, paciência e suporte indispensáveis.

Agradeço de coração à minha orientadora, Eleni, e à minha coorientadora, Eliana, por sua orientação sábia, dedicação e valiosas contribuições, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. Sua paciência, incentivo e os desafios que me apresentaram foram cruciais para o meu crescimento acadêmico.

Ao professor João Pizauro, pelos valiosos conselhos e pela troca enriquecedora de conhecimento ao longo dos últimos anos, que contribuíram significativamente para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos coorientadores Camila e Cleiton, expresso minha gratidão pelo apoio adicional e pelas contribuições significativas à minha pesquisa. Sua expertise e orientação foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao técnico João Carlos, agradeço a disponibilidade, habilidade e dedicação no suporte às atividades práticas e experimentais. Sua experiência e conhecimento foram indispensáveis para o sucesso dos experimentos realizados.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas (LBMP) que contribuíram na minha jornada com amizade, companheirismo e me auxiliando sempre que necessário;

A todos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) que contribuíram na minha jornada com amizade, companheirismo e me auxiliando sempre que necessário;

Aos meus queridos amigos do "clubinho da ciência" — Luiz Flávio, Nayara, Vítor, Tadeu, Edvânia e Caroline— minha eterna gratidão por me motivarem e por não permitirem que eu desistisse.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar pela parceria.

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigado, vocês foram muito importantes.

Muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer).

Resumo

O ácido chiquímico é um intermediário metabólico essencial na via do chiquimato, presente em plantas, fungos, bactérias e outros organismos, mas ausente em animais. Essa via metabólica é crucial para a biossíntese de metabólitos secundários, como aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina), além de compostos fenólicos, alcaloides e outros metabólitos de relevância biológica e industrial. Esta tese objetivou a produção de ácido chiquímico por meio da fermentação submersa utilizando um isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum. isolado do solo avaliando a influência de diferentes meios de cultivo. A pesquisa foi conduzida em quatro eixos principais: (i) análise de isolados por meio de ensaios de fermentação e sequenciamento do gene 16S rRNA; (ii) estudo da produção de ácido chiquímico em diferentes meios de cultivo; (iii) quantificação do ácido chiquímico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e (iv) identificação do composto por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os resultados demonstraram que o isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum é capaz de produzir ácido chiquímico em concentrações de aproximadamente 18 g/L após 20 horas de fermentação no meio Horikoshi. Além disso, experimentos realizados com modificações no meio Horikoshi ou com a adição de substratos como ácido ferúlico não inibiram o crescimento do isolado não afetaram a produção de ácido chiquímico. Por fim, a combinação das análises de HPLC e RMN permitiu a quantificação e a confirmação da produção de ácido chiquímico pelo isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum. Portanto, do ponto de vista tecnológico o estudo apresenta potencial para a produção de ácido chiquímico, devido à presença de genes que codificam as enzimas essenciais da via metabólica responsável por sua síntese.

Palavras-chave: ácido chiquímico, via do chiquimato, biotecnologia, metabolismo secundário, compostos bioativos.

Abstract

Shikimic acid is an essential metabolic intermediate in the shikimate pathway, present in plants, fungi, bacteria, and other organisms, but absent in animals. This metabolic pathway is crucial for the biosynthesis of secondary metabolites, such as aromatic amino acids (phenylalanine, tryptophan, and tyrosine), as well as phenolic compounds, alkaloids, and other biologically and industrially relevant metabolites. This thesis aimed to produce shikimic acid through submerged fermentation using an isolate of *Paenibacillus* sp. JAB-Hum, obtained from soil, by evaluating the influence of different culture media. The research was conducted across four main axes: (i) analysis of isolates through fermentation assays and 16S rRNA gene sequencing; (ii) study of shikimic acid production in different culture media; (iii) quantification of shikimic acid by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC); and (iv) compound identification by Nuclear Magnetic Resonance (RMN). The results demonstrated that the *Paenibacillus* sp. JAB-Hum isolate can produce shikimic acid at concentrations of approximately 18 g/L after 20 hours of fermentation in Horikoshi medium. Furthermore, experiments conducted with modifications to the Horikoshi medium or with the addition of substrates such as ferulic acid did not inhibit the growth of isolation and did not affect shikimic acid production. Finally, the combination of HPLC and NMR analyses enabled the quantification and confirmation of shikimic acid production by the *Paenibacillus* sp. JAB-Hum isolate. Therefore, from a technological perspective, this study presents potential for shikimic acid production due to the presence of genes encoding the essential enzymes of the metabolic pathway responsible for its synthesis.

Keywords: shikimic acid, shikimate pathway, biotechnology, secondary metabolism, bioactive compounds

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Estrutura química do ácido chiquímico. O composto apresenta um anel de seis carbonos, um grupo carboxílico (-COOH) e três grupos hidroxila (-OH).

-----30

Figura 2. Via metabólica do ácido chiquímico.

-----19

Figura 3. Análise de identificação da sequência genética realizada por meio da ferramenta BLAST, confirmando a classificação do isolado JAB-Hum como pertencente ao gênero *Paenibacillus* sp.

-----30

Figura 4. Árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA do isolado JAB-HUM, construída utilizando o método de máxima verossimilhança. Os valores bootstrap (%) são indicados nos nós.

-----31

Figura 5. Cromatograma obtido por HPLC para o isolado bacteriano *Paenibacillus* sp. (JAB-Hum). (A) Cromatograma da amostra fermentada, com os picos identificados: 1 – vanilina e 2 – ácido ferúlico. (B) Cromatograma do padrão de vanilina utilizado como referência.

-----34

Figura 6. Curva de crescimento celular em meio Horikoshi, MLB e MLM. A absorbância foi medida por densidade óptica em espectrofotômetro a 600_{nm}.

-----35

Figura 7. Viabilidade celular do *Paenibacillus* em diferentes meios de cultivo ao longo do tempo. Os resultados são apresentados como porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células em cada ponto temporal. As barras representam a média de três experimentos independentes, e as linhas de erro indicam o desvio padrão para cada meio de cultivo.

-----36

Figura 8. Gel de acrilamida 10% SDS – Page, contendo amostras provenientes da célula do cultivo. Canaletas: M– marcador de massa molecular (“Precision Plus Protein Dual Color Standards” – BioRad); HK – Horikoshi; LB – MLB; LM-MLM; 4, 8, 16 e 24 horas de cultivo.

-----38

Figura 9. Densidade óptica do isolado JAB-Hum em resposta às concentrações de ácido ferúlico (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg L⁻¹). As leituras de absorbância foram realizadas a 600 nm utilizando espectrofotometria.

-----39

Figura 10. Quantificação do ácido ferúlico por HPLC ao longo das 20 horas de fermentação. As concentrações testadas para a tolerância do isoaldo de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum foram 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg/L.

-----40

Figura 11. Cromatograma obtido por HPLC para os padrões de conversão do ácido ferúlico. (1 – ácido vanílico, 2 – vanilina e 3 – ácido ferúlico).

-----41

Figura 12. Cromatograma obtido por HPLC para o tempo de 8 horas de cultivo nas concentrações de ácido ferúlico de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg L⁻¹. O pico 1 corresponde ao composto a ser investigado, enquanto o pico 2 representa o ácido ferúlico.

-----42

Figura 13. Cromatograma obtido por HPLC para o padrão de ácido chiquímico.

-----43

Figura 14. Perfil cromatográfico obtido por HPLC do ácido chiquímico. A- Cromatograma do teste de tolerância. B- Cromatograma padrão da literatura.

-----44

Figura 15. Quantificação do ácido chiquímico por HPLC ao longo das 20 horas de fermentação.

-----44

Figura 16. Quantificação de ácido chiquímico em meio suplementado com ácido ferúlico por HPLC ao longo das 20 horas de fermentação.

-----45

Figura 17. Perfil de crescimento bacteriano ao longo do tempo de fermentação, por análises de absorbância. Controle – meio Horikoshi completo; Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.

-----47

Figura 18. Quantificação do ácido chiquímico foi realizada considerando o tempo de cultivo e a quantidade produzida em cada meio avaliado. Os tratamentos analisados incluíram o: Controle – meio Horikoshi completo; Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.

-----48

Figura 19. Gel de acrilamida 10% SDS – PAGE, contendo amostras provenientes da célula sonicada do cultivo. Canaletas: M– marcador de massa molecular (“Precision Plus Protein Dual Color Standards” – BioRad); C. Controle – meio Horikoshi completo; T1. Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; T2. Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.

-----50

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (DSO, 300 MHz) de AC de *Eichhornia crassipes* **(a)** e de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum **(b)**.

-----51

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (DSO, 400 MHz) de AC isolado de *Paenibacillus* sp..

-----53

Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (DSO, 400 MHz) de AC isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum **a** – Espectro da amostra de ácido chiquímico mostrando a localização dos prótons de carbono. **b** – Espectro da amostra de ácido chiquímico mostrando o deslocamento químico após análise detalhada dos picos através do software Spinworks4.

-----54

Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (DSO) de amostras puras de AC, **a** (Cardoso, 2013) e **b** (SDBS - Spectral code:CDS-11-968).

-----56

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Compostos fenólicos: usos e fontes naturais.	
-----	16
Tabela 2. Aplicações do ácido chiquímico em diversas áreas industriais e biotecnológicas.	
-----	17
Tabela 3. Identificação dos gêneros bacterianos por sequenciamento do gene 16S rRNA.	
-----	29
Tabela 4. Capacidade de bioconversão das bactérias testadas em relação aos compostos AF, 4VG, VAN e AV. Os espaços vazios indicam que a bactéria não foi capaz de produzir o respectivo composto, enquanto os "X" indicam que a bactéria foi capaz de produzi-lo.	
-----	33
Tabela 5. Viabilidade Celular (UFC/mL) nos Meios de Cultivo em Diferentes Intervalos de Tempo.	
-----	36
Tabela 6. Quantificação de vanilina e ácido vanílico produzidos ao longo de 20 horas de fermentação.	
-----	40
Tabela 7. Quantificação do ácido chiquímico produzidos ao longo de 24 horas de fermentação. Controle – meio Horikoshi completo; Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.	
-----	49
Tabela 8. Deslocamento químico (valores em ppm) do próton de H da amostra fermentada de <i>Paenibacillus</i> sp. e de uma amostra referência pura de ácido chiquímico.	
-----	52
Tabela 9. Deslocamento químico (valores em ppm) do núcleo de carbono obtido através da análise de RMN ¹³ C da amostra fermentada de <i>Paenibacillus</i> sp. e deslocamento do nucle de carbono de uma amostra referência pura de ácido chiquímico.	
-----	55
Tabela 10. Deslocamento químico (valores em ppm) e multiplicidade dos sinais do núcleo de hidrogênio obtido através da análise de RMN ¹ H da amostra fermentada.	
-----	56

Sumário

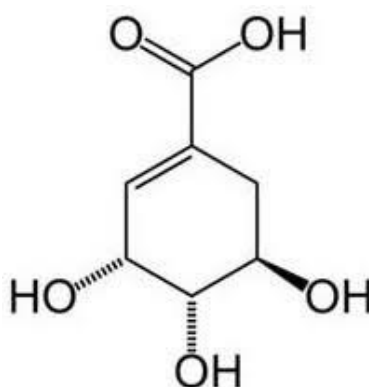
Resumo	14
Abstract	15
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS.....	19
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVO	25
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1 <i>PAENIBACILLUS</i>	26
3.2 ÁCIDOS FENÓLICOS.....	27
3.2 ÁCIDO CHIQUÍMICO	28
3.3 VIA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO	30
3.5 ENZIMAS DA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO.....	32
3.6 PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DO ÁCIDO CHIQUÍMICO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 MEIOS DE CULTIVO	36
4.2 FERMENTAÇÃO DE <i>PAENIBACILLUS</i> SP. JAB-HUM.....	36
4.2.1 Pré-inóculo.....	36
4.2.2 Fermentações	36
4.3 SCREENING PARA SELEÇÃO DE ISOLADOS BIOCONVERSORES DO ÁCIDO FERÚLICO.	37
4.4 HPLC - HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	37
4.5 SEQUENCIAMENTO SANGER (GENE 16 RRNA).....	37
4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	38
4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA	38
4.9 CURVA DE CRESCIMENTO	39
4.9.1 Unidades Formadoras De Colônias (UFC)	39
4.9.2 Viabilidade Celular	39
4.10 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	39
4.11 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ÁCIDO FERÚLICO	40
4.12 AVALIAÇÃO DE NUTRIENTES.....	40
4.13 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	40
4.13.1 Análise do extrato fermentativo por RMN de ¹ H	40
4.13.2 Análise do extrato fermentativo por RMN de ¹³ C	41
4.13.3 Caracterização química do Ácido Chiquímico.....	41

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	42
5.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA	43
5.5	TESTE DE TOLERÂNCIA	51
5.6	ÁCIDO CHIQÚMICO	56
5.7	AVALIAÇÃO DE NUTRIENTES.....	59
5.8	RMN - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	64
6.	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE	79

1. INTRODUÇÃO

O ácido chiquímico, isolado em 1885 por Johan Fredrik Eykman, é um α -isômero cujo nome IUPAC (Union of Pure and Applied Chemistry) é ácido 3,4,5-trihydroxy-1-ciclohexeno-1-carboxílico. Sua estrutura contém um anel de seis carbonos, um grupo carboxílico e três carbonos quirais (Figura 1). Quando extraído da planta *Illicium verum* (anis estrelado), o ácido chiquímico apresenta um ponto de fusão de 187°C e é caracterizado por sua forma cristalina branca. Além disso, é solúvel em água, o que facilita sua utilização em várias aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (RABELO, 2016).

Figura 1. Estrutura química do ácido chiquímico. O composto apresenta um anel de seis carbonos, um grupo carboxílico (-COOH) e três grupos hidroxila (-OH).



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8742>

Recentemente, a produção de compostos hidroaromáticos por meio de processos biológicos tem sido amplamente estudada e considerada promissora, devido ao grande potencial de aplicação no mercado em diversos setores, como farmacêutico e agrícola (SHENG *et al.*, 2023). Dentre esses compostos, destaca-se o ácido chiquímico, uma substância de alto valor de mercado, produzida exclusivamente por microrganismos e plantas. A síntese desse composto ocorre através da via do ácido chiquímico, um caminho metabólico essencial envolvido na biossíntese de diversos compostos fenólicos que possuem relevância biológica (MARCHIOSI *et al.*, 2020).

Essa via metabólica é fundamental para a produção de aminoácidos aromáticos essenciais, como fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais desempenham papéis críticos na fisiologia dos organismos. A ausência dessa via em mamíferos, em contraste com sua presença em microrganismos e plantas, torna-a um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e agrícolas. Isso inclui a criação de antibióticos que inibam seletivamente microrganismos patogênicos e de herbicidas que possam ser usados de forma eficaz e segura em práticas agrícolas (MARCHIOSI *et al.*, 2020).

Embora a produção biológica de compostos aromáticos tenha ganhado destaque no mercado de insumos industriais, a síntese química tradicional ainda desempenha um papel importante na obtenção desses compostos. Historicamente, a síntese química tem sido

amplamente utilizada para produzir ácido chiquímico e seus derivados, oferecendo maior controle sobre os processos reacionais e possibilitando a modificação estrutural dos compostos. No entanto, esse método apresenta limitações significativas, incluindo o uso de reagentes tóxicos como, KMnO_4 , H_2CrO_4 , H_2O_2 e $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$ e condições de reação rigorosas, além de impactos ambientais adversos (SHENG *et al.*, 2023). Esses desafios têm motivado a busca por alternativas mais sustentáveis, como os processos biológicos, que se destacam por utilizarem matérias-primas renováveis e apresentarem menor impacto ambiental (SHENG *et al.*, 2023).

Essas alternativas biológicas não apenas minimizam o uso de substâncias tóxicas, mas também contribuem para a sustentabilidade. Com o aumento dos estudos para a produção do ácido chiquímico através de microrganismos ou plantas, essa abordagem vem crescendo e sendo considerada uma alternativa melhor. Isso se deve ao fato de que os processos biológicos podem resultar em produtos mais puros, com menor necessidade de etapas de purificação (SHENG *et al.*, 2023).

Entre os microrganismos que apresentam potencial para a produção de ácido chiquímico por meio da via metabólica do ácido chiquímico, encontram-se bactérias e fungos. Esses microrganismos não apenas metabolizam precursores naturais, como glicose e outros açúcares, mas também possuem a capacidade de realizar modificações enzimáticas que favorecem a síntese de compostos de interesse. Na literatura, estão descritos organismos como *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium leprae* que visam otimizar a produção de ácido chiquímico (SHENG *et al.*, 2023) (JUNIOR, 2006).

O uso de bactérias do gênero *Bacillus* para a produção de ácido chiquímico é uma prática estabelecida há aproximadamente 10 anos (LIMA, 2017). No estudo de GHOSH *et al.*, (2014), *Bacillus megaterium* foi empregado como biocatalisador, convertendo ácido quínico em ácido chiquímico com uma eficiência de conversão de até 89% em condições otimizadas. Embora outros estudos com *Bacillus* sp. sejam encontrados na literatura, ainda não há relatos de pesquisas utilizando *Paenibacillus* sp. para essa finalidade.

O gênero *Paenibacillus* é amplamente reconhecido por sua diversidade metabólica e capacidade de sintetizar uma variedade de compostos bioativos, incluindo antibióticos, enzimas industriais e metabólitos de interesse biotecnológico (GRADY *et al.*, 2016). Estudos sobre a fisiologia e as vias metabólicas do *Paenibacillus* sp. podem oferecer novas perspectivas para a produção de compostos de alto valor agregado, ampliando as opções biológicas e favorecendo processos mais sustentáveis e eficientes (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009) (ALVEZ *et al.*, 2019).

Dessa forma, a busca por novos microrganismos, como *Paenibacillus* sp., para a produção de ácido chiquímico representa uma oportunidade promissora para a biotecnologia. Estudo futuros da fisiologia e vias metabólicas envolvidas na produção do ácido chiquímico são fundamentais para compreender melhor o processo e possibilitar a caracterização e otimização da fermentação. Dessa forma, será possível obter resultados que ampliem as opções biológicas

disponíveis, favorecendo processos mais sustentáveis e potencialmente mais eficientes para a síntese de compostos de alto valor agregado. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de ácido chiquímico por um isolado de *Paenebacillus* sp. em fermentação submersa avaliando a influência do meio de cultivo.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a produção de ácido chiquímico através da fermentação submersa de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum isolado do solo, avaliando a influência do meio de fermentação.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para chegar ao objetivo geral deste trabalho foram atingidos os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar isolados bioconversores do ácido ferúlico
- Analisar o sequenciamento do gene 16S rRNA
- Selecionar o melhor meio de cultivo para o microrganismo
- Analisar o gel do perfil enzimático da fermentação
- Testar a tolerância do isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum ao ácido ferúlico
- Analisar a quantificação do ácido chiquímico por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- Identificar estrutura do ácido chiquímico no meio de cultivo por RMN

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PAENIBACILLUS

Paenibacillus é um gênero de bactérias que apresentam forma de bastonete, classificadas como Gram-positivas. Essas bactérias são anaeróbicas facultativas ou estritamente aeróbicas, com crescimento ótimo na faixa de temperatura de 28 a 40°C e em pH neutro ou alcalino. Inicialmente, foram incluídas no gênero *Bacillus*, no entanto, devido a diferenças morfológicas, *Paenibacillus* foi separado como um novo gênero (PATOWARY; DEKA, 2020).

Esse gênero pode ser utilizado em diversas áreas, como na agricultura, onde apresenta capacidade para realizar fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e de potássio, além de frequentemente atuar como agente de biocontrole, *Paenibacillus* também tem a capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS), que podem ser importantes para diversas aplicações industriais e ambientais, além de estar presentes nas cadeias de produção de hidrocarbonetos poliaromáticos (PATOWARY; DEKA, 2020).

A produção de substâncias está diretamente ligada aos meios de cultivo nos quais a bactéria é cultivada, pois cada meio fornece diferentes fontes de carbono e nitrogênio. A produção também é influenciada pelo pH, temperatura e aeração, fatores que afetam diretamente o metabolismo e a fisiologia microbiana (CARVALHO, 2020). Nesse contexto, o gênero *Paenibacillus* vem se destacando em vários estudos devido a sua ampla gama de atuação e adaptabilidade em diferentes ambientes, o que o torna um excelente modelo para pesquisas relacionadas à otimização de processos de cultivo microbiano (PATOWARY; DEKA, 2020).

Esse gênero apresenta aplicações em diversas áreas, como na agricultura, onde espécies como *Paenibacillus polymyxa* atuam na promoção do crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios (ANANDAN; VITTAL, 2019), na biodegradação, com cepas capazes de degradar compostos orgânicos complexos, contribuindo para o tratamento de resíduos e biorremediação de solos contaminados (GRADY *et al.*, 2016). Além disso, esse gênero também pode desempenhar um papel importante na produção de compostos fenólicos, como o ácido chiquímico, entre outros (LIU *et al.*, 2020). Essas características reforçam a versatilidade do gênero *Paenibacillus* e seu potencial em diversas áreas biotecnológicas.

Nos últimos anos, *Paenibacillus* tem atraído grande interesse devido às suas diversas aplicações biotecnológicas e ambientais (KARYOLAIMOS *et al.*, 2019). As bactérias desse gênero são notáveis por sua capacidade de sintetizar enzimas hidrolíticas, como celulasas e amilases, essenciais para processos industriais de degradação de biomassa e produção de biocombustíveis (BERNAL *et al.*, 2013). Algumas espécies de *Paenibacillus* possuem propriedades antimicrobianas, sendo exploradas como alternativas naturais para o controle

biológico de patógenos em plantas, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis. Sua habilidade em promover o crescimento vegetal e fixar nitrogênio no solo reforça ainda mais o potencial agrícola desse gênero (KARYOLAIMOS *et al.*, 2019). Essas características fazem de *Paenibacillus* uma bactéria de grande importância tanto para a biotecnologia quanto para a agricultura, destacando seu papel em soluções ecológicas e inovadoras.

3.2 ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos são compostos bioativos presentes em fontes de vegetais, como os ácidos hidroxibenzóicos (anel aromático com grupos hidroxila e/ou metoxi ligados diretamente ao anel) e os hidroxicinâmicos (cadeia propênica acoplada ao anel aromático.), que são as duas classes mais comuns de grupos funcionais dos ácidos fenólicos (RASHMI; NEGI, 2020). Sua estrutura é caracterizada pela posição e quantidade de grupos metoxi e hidroxil ligados ao anel aromático, o que determina suas propriedades (VALANCIENE *et al.*, 2020). Esses compostos podem ser encontrados em várias fontes, como frutas, especiarias, grãos e bebidas. Os ácidos fenólicos têm ganhado destaque devido à sua ampla gama de benefícios para saúde, incluindo atividades antioxidantes, imuno reguladoras, antimicrobiana, antioxidante, entre outras (RASHMI; NEGI, 2020).

Devido ao crescente interesse pelos ácidos fenólicos, os métodos analíticos vêm se desenvolvendo, principalmente por causa de seus papéis biológicos como metabólitos secundários. Esse interesse também se deve ao seu potencial efeito protetor contra danos oxidativos em seres humanos, por meio da ingestão de frutas e legumes que apresentam tal potencial (ROBBINS, 2003). Para compreender melhor esses efeitos e seu potencial terapêutico, é importante diferenciar os tipos de fenóis presentes nas plantas.

Os ácidos fenólicos fazem parte de uma categoria maior de metabólitos frequentemente chamados de compostos fenólicos (Tabela 1). Atualmente, os compostos fenólicos são divididos em polifenóis e fenóis simples, levando em consideração o número de subunidades fenólicas presentes. Os polifenóis possuem pelo menos duas subunidades fenólicas, incluindo os flavonoides, enquanto os compostos que possuem três ou mais subunidades fenólicas são chamados de taninos (ROBBINS, 2003).

Tabela 1. Compostos fenólicos: usos e fontes naturais.

Composto fenólico	Principal uso	Matéria-prima	Referência
Ácido Gálico	Conservante alimentar	Mel	Madeira, 2021.
Ácido Ferúlico	Cosmética	Plantas	Marcato, 2019.
Ácido Cafeico	Antioxidante	Café e Frutas cítricas	Soares, 2002.
Ácido p-cumárico	Antioxidante e Antibacteriano	Cereais	Boz, 2015.

Os principais ácidos hidroxibenzóicos são o ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico encontrados principalmente em especiarias e algumas ervas. Já os ácidos hidroxicinâmicos ocorrem na natureza principalmente como ésteres e podem ser encontrados em café, vinho, cacau, cereais e frutas (BENTO-SILVA *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos podem se originar de diversas fontes, como a lignina que ao ser despolimerizada ou degradada libera compostos como a vanilina (LUZIATELLI *et al.*, 2019), álcool vanílico (CIVOLANI *et al.*, 2000), ácido gálico (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2023), ácido ferúlico (SIBHATU *et al.*, 2021) e ácido chiquímico (SHENG *et al.*, 2023). Esses são apenas alguns exemplos de compostos presentes na degradação da lignina, uma fonte riquíssima de compostos aromáticos (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2023).

Vale ressaltar que os ácidos fenólicos vêm ganhando espaço no mercado devido à sua relevante utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e química. Por exemplo, o ácido ferúlico já é utilizado pela indústria alimentícia como matéria-prima para a produção de vanilina e na indústria cosmética em diversos produtos para a pele. Outro exemplo é o ácido gálico, que está presente nas indústrias alimentícia, cosmética, na fabricação de corantes, na formulação de rações, entre outras aplicações (VALANCIENE *et al.*, 2020).

Uma alternativa para produção de compostos fenólicos oriundos de fontes vegetais é a utilização de microrganismos, que tem emergido como uma alternativa promissora, pois apresenta várias vantagens como, maior controle sobre o processo de produção, redução de custos, e menor impacto ambiental. Além disso, essa abordagem biotecnológica permite a produção em larga escala de compostos fenólicos de alta pureza, o que é altamente desejável para aplicações em indústrias como a farmacêutica, cosmética e alimentícia (VALANCIENE *et al.*, 2020).

3.2 ÁCIDO CHIQUÍMICO

O ácido chiquímico é classificado como um ácido fenólico e atua como um intermediário na via biossintética do metabolismo de compostos aromáticos, como ácidos fenólicos e

flavonoides. Embora não se encaixe diretamente nas subclasses de ácidos hidroxibenzóicos ou hidroxicinâmicos, o ácido chiquímico é crucial para a produção de vários outros compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonoides, e pode ser encontrado em diversas plantas, como anis estrelado e pinheiros (SHENG *et al.*, 2023).

Além de ser um produto natural hidroxiaromático essencial para produção de outros compostos aromáticos, o ácido chiquímico desempenha um papel significativo para a indústria farmacêutica, participando na síntese química de medicamentos e estando envolvido em diferentes compostos bioativos (SHENG *et al.*, 2023).

A via do ácido chiquímico realiza a síntese da maioria dos compostos fenólicos de origem vegetal, produzindo aminoácidos aromáticos como fenilalanina, a tirosina e o triptofano, além de seus derivados (PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2014). Essa via está presente em bactérias, plantas e fungos, mas está ausente em animais (MARCHIOSI *et al.*, 2020). Além de ser fundamental no metabolismo vegetal, a via do ácido chiquímico contribui para a formação de diversos metabolitos secundários, que desempenham funções vitais nas plantas, como, defesa, síntese de ligninas, alcaloides aromáticos e flavonoides (SCALABRIN *et al.*, 2016). Essa via também fornece esqueletos de carbono para produção de outros compostos, como ácido indol-3-acético (AIA), tetra-hidrofolato (vitamina B9), ácido salicílico, pigmentos vegetais, entre outros (MARCHIOSI *et al.*, 2020).

Além disso, o ácido chiquímico é empregado na indústria cosmética devido as suas propriedades desodorizantes, esfoliante, antiacne, antibacteriana, estimulante de crescimento capilar, além de possuir ação hidratante e clareadora (BATORY; ROTSZTEJN, 2022).

Atualmente, existem dois processos principais para a produção de ácido chiquímico. O primeiro é o processo químico, que apresenta baixo rendimento comercial e gera grande quantidade de resíduos poluentes. O segundo é o processo biológico, que utiliza microrganismos para produzir o ácido chiquímico por meio de fermentação. Este método é considerado uma alternativa de maior qualidade, devido à sua maior eficiência e menor impacto ambiental (SHENG *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a identificação e utilização de microrganismos capazes de produzir ácido chiquímico se tornam de extrema importância, uma vez que eles representam uma fonte sustentável e viável para a produção em larga escala desse composto. A busca por novas cepas microbianas, bem como a engenharia genética para otimizar os microrganismos existentes, oferece uma oportunidade única para aumentar os rendimentos da produção e reduzir os custos industriais. Além disso, explorar a biodiversidade microbiana pode levar à descoberta de novas vias metabólicas, aumentando a eficiência do processo biotecnológico.

A produção biológica de compostos fenólicos, como o ácido chiquímico, tem se mostrado uma alternativa promissora por possibilitar sua produção em larga escala, com a vantagem de utilizar glicose como fonte de carbono. Além disso, esse processo biotecnológico permite a

geração de aminoácidos essenciais e metabólitos secundários importantes em diversos microrganismos (GHOSH *et al.*, 2012).

Com o aprimoramento das técnicas de fermentação, o ácido chiquímico tem se destacado cada vez mais nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (BATORY; ROTSZTEJN, 2022). Sua versatilidade e potencial para a produção sustentável de compostos bioativos reforçam sua importância, contribuindo para o desenvolvimento industrial de maneira eficiente e ambientalmente consciente (SHENG *et al.*, 2023).

A Tabela 2 apresenta algumas aplicações do ácido chiquímico, destacando sua versatilidade em diversas indústrias, como farmacêutica, agrícola, cosmética e biotecnológica. Ela resume as funções e os benefícios desse composto, incluindo sua utilização como precursor na produção de antivirais, herbicidas, antioxidantes e compostos antimicrobianos, além de seu potencial no desenvolvimento de novos produtos em diversas áreas.

Tabela 2. Aplicações do ácido chiquímico em diversas áreas industriais e biotecnológicas.

Áreas de aplicação	Principais aplicações	Referência
Indústria Farmacêutica	Síntese de Oseltamivir (Tamiflu®), síntese de antibióticos, anti-inflamatórios e agentes antiparasitários	(WU <i>et al.</i> , 2022)
Agricultura	Herbicidas, Biofertilizantes e biocontrole	(MARKAKIS <i>et al.</i> , 2016)
Indústria Química	Produção de compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides e síntese de compostos aromáticos sustentáveis	(SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2019)
Indústria cosmética	Potencial antioxidante	(BATORY & ROTSZTEJN, 2021)

3.3 VIA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO

A via do ácido chiquímico envolve sete enzimas responsáveis por converter fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato em corismato como produto final. Algumas dessas enzimas são promissoras para a produção de novos antibióticos e pesticidas. Além disso, essa rota é utilizada na biossíntese de compostos e aminoácidos aromáticos (HERRMANN; WEAVER, 1999).

Ela envolve uma série de reações enzimáticas essenciais para a conversão de precursores em corismato. A primeira etapa envolve a condensação do fosfoenolpiruvato e eritrose4-fosfato, resultando na formação de ácido 3-deoxi-D-arabino heptulosônico 7-fosfato, catalisada pela enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato7-fosfato sintase (DAHPS) (ARCURI, 2008).

Na etapa seguinte, ocorre a formação do 3-desidroquinato, onde a enzima 3-desidroquinato sintase (DHQS) promove a perda de um grupo fosfato e clivagem do composto inicial. Essa reação envolve uma oxidação e uma redução resultando na eliminação de fosfato (ARCURI, 2008).

A terceira etapa envolve a desidratação do substrato pela ação da enzima 3-desidroquinato desidratase (DHQD), formando 3-desidrochiquimato. Essa enzima existe em duas formas, tipo I que atua na via do ácido chiquímico, e tipo II envolvido na biossíntese e catálise (ARCURI, 2008).

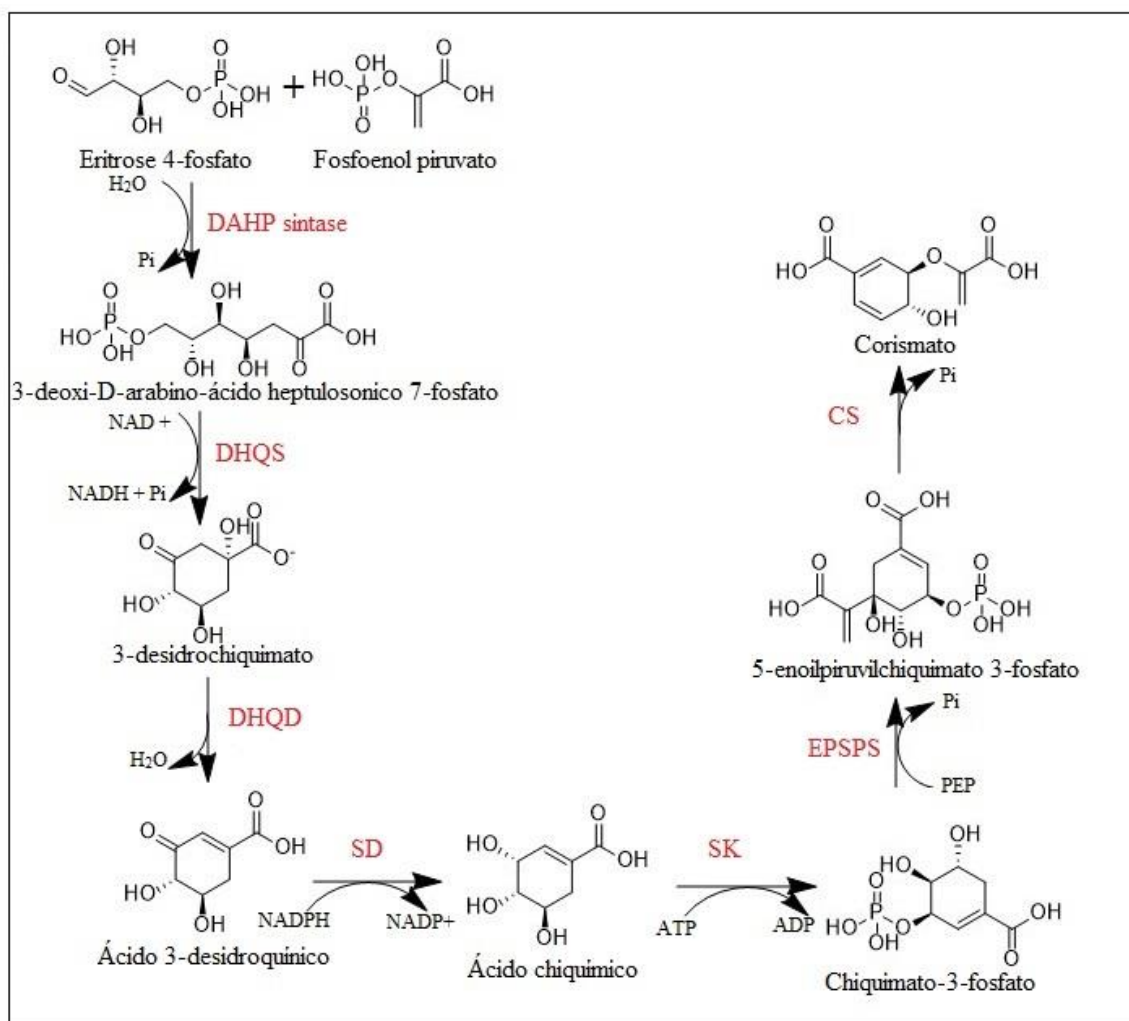
A quarta reação é catalisada pela enzima chiquimato-5-desidrogenase (SD), que reduz o substrato usando o NADH, formando ácido chiquímico. O mecanismo de reação dessa enzima envolve a transferência de hidreto para coenzima NAD(P)H, estabilizando o acúmulo de carga negativa no substrato (ARCURI, 2008).

Na quinta etapa, a enzima chiquimato quinase (SK) fosforila o grupo 3-hidroxil, utilizando o ATP e formando chiquimato-3-fosfato. Essa enzima pode ser inibida pelos aminoácidos triptofano (Try) e tirosina (Trp) (ARCURI, 2008).

A sexta reação é realizada pela enzima 5-enoilpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a condensação do substrato para produzir do 5-enoilpiruvilchiquimato 3-fosfato (ARCURI, 2008).

A última etapa é conduzida pela enzima corismato sintase (CS), que remove o grupo fosfato do substrato, resultando na formação de corismato como produto final (Figura. 2) (ARCURI, 2008).

Figura 2. Via metabólica do ácido chiquímico. DAHP sintase - 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase; DHQS - Desidroquinato sintase; DHQD - 3-Desidroquinato desidratase; SD - Chiquimato-5-Desidrogenase; SK - Chiquimato quinase; EPSPS - 5-Enoilpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase e CS - Corismato sintase.



Adaptado de (ARCURI, 2008).

3.5 ENZIMAS DA VIA METABÓLICA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO

As enzimas da via metabólica do ácido chiquímico, em bactérias, estão distribuídas em sete cadeias polipeptídicas individuais, cada uma sendo codificada por genes separados. Essa organização genética permite um controle regulatório fino sobre cada etapa da via (ARCURI, 2008).

3.5.1. 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS)

A primeira enzima da via do ácido chiquímico é a 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), classificada sob o número EC 2.5.1.54. Essa enzima é uma metaloenzima, ou seja, requer um íon metálico para sua atividade catalítica, a primeira etapa da via do ácido chiquímico, essencial para a biossíntese de compostos aromáticos em microrganismos e plantas (ARCURI, 2008).

3.5.2. Desidroquinato sintase (DHQS),

Na segunda etapa da via do ácido chiquímico, está envolvida a enzima 3-desidroquinato sintase (DHQS), classificada sob o número EC 4.2.3.4. Sua ativação depende da presença de fosfato inorgânico (Pi) e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), que atuam como cofatores cruciais para a eficiência catalítica da enzima (CARPENTER *et al.*, 1998).

3.5.3. 3-Desidroquinato desidratase (DHQD)

A terceira reação da via do ácido chiquímico é realizada pela enzima 3-desidroquinato desidratase (DHQD), classificada sob o número EC 4.2.1.10. Esta enzima atua de duas maneiras: o tipo I participa diretamente na via metabólica do ácido chiquímico, envolvido na síntese de aminoácidos aromáticos. Já o tipo II está envolvido em processos de biossíntese e catálise (COGGINS *et al.*, 2003).

3.5.4. Chiquimato-5-Desidrogenase (SD)

Na quarta reação da via do ácido chiquímico, a enzima chiquimato-5-desidrogenase (SD), classificada sob o número EC 1.1.1.25, desempenha um papel crucial, utilizando NADPH como coenzima. Sua reação ocorre via transferência de hidretos da coenzima para o substrato, estabilizando a carga negativa e promovendo a síntese de ácido chiquímico. A chiquimato desidrogenase pertence à família das óxido-redutases e é composta por dois domínios α/β . O sítio de ligação do substrato é formado por resíduos do domínio N-terminal, enquanto o sítio de ligação ao cofator está localizado no C-terminal, formando uma dobra de Rossmann (DÍAZ-QUIROZ *et al.*, 2018).

3.5.5. Chiquimato quinase (SK)

A quinta reação da via do ácido chiquímico é catalisada pela enzima chiquimato quinase (SK), classificada sob o número EC 2.7.1.71. Essa enzima promove a fosforilação do ácido chiquímico, utilizando ATP como doador de fosfato para formar chiquimato-3-fosfato. Para realizar essa reação, a SK requer cátions divalentes como cofatores, sendo os mais comuns o magnésio (Mg²⁺), o ferro (Fe²⁺) e o cálcio (Ca²⁺), que são essenciais para a atividade enzimática e a estabilização da estrutura do substrato (KRELL *et al.*, 1998).

3.5.6. 5-Enoilpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPS)

A sexta reação da via do ácido chiquímico é catalisada pela enzima 5-enoilpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPS), classificada sob o número EC 2.5.1.19. Essa enzima pode ser inibida através do glifosato, um componente ativo de muitos herbicidas, atua como um inibidor competitivo reversível da EPSPS, ligando-se ao sítio ativo da enzima e bloqueando a reação, o que interfere na síntese de aminoácidos aromáticos, essenciais para o crescimento das plantas (ARCURI, 2008).

3.5.7. Corismato sintase (CS)

A última reação da via do ácido chiquímico é catalisada pela enzima corismato sintase (CS), classificada sob o número EC 4.2.3.5. Essa enzima desempenha um papel crucial na síntese de corismato, o produto final da via. Para a sua atividade, a corismato sintase requer a presença da molécula de flavina mononucleotídeo (FMN), que atua como um cofator, facilitando a reação que transforma o substrato em corismato (MACHEROUX *et al.*, 1999).

3.6 PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DO ÁCIDO CHIQUÍMICO

A produção de ácido chiquímico é realizada principalmente por métodos químicos, os quais se baseiam em reações de síntese orgânica a partir de precursores químicos comercialmente disponíveis. Esse processo envolve uma série de etapas altamente controladas, como condensações, ciclizações e reações de oxidação ou redução, projetadas para formar o anel cicloexano característico e os grupos funcionais específicos do ácido chiquímico. No entanto, esses métodos apresentam limitações significativas, incluindo baixos rendimentos, geração de resíduos poluentes e altos custos de produção (SHENG *et al.*, 2023).

Devido a essas limitações, a produção comercial desse composto tem se concentrado na extração a partir de *Illicium verum* (anis-estrelado), que também enfrenta desafios, como o alto custo de produção e a geração de resíduos poluentes. No entanto, com o avanço das pesquisas envolvendo microrganismos capazes de realizar a via do ácido chiquímico por meio de fermentação, essa abordagem tem sido considerada uma alternativa mais vantajosa em comparação aos métodos tradicionais de produção (SHENG *et al.*, 2023).

Essa busca por métodos mais eficientes e sustentáveis se justifica pelo fato de o ácido chiquímico ser amplamente utilizado na produção do medicamento antiviral oseltamivir (Tamiflu®), indicado no combate à influenza viral. Além disso, possui aplicações na inibição do sistema de coagulação, na prevenção de trombose, e como agente analgésico e anti-inflamatório. Devido à sua ampla utilização e à crescente demanda, o preço do ácido chiquímico no mercado tem aumentado significativamente (WU *et al.*, 2022).

Um exemplo de sua importância é que são necessários 1,3 g de ácido chiquímico para produzir 10 unidades do medicamento Tamiflu®, quantidade que, frequentemente, é utilizada por apenas um paciente. A necessidade estimada de produção de ácido chiquímico apenas para atender à demanda do Tamiflu® é de 520 toneladas anuais (WU *et al.*, 2022).

Esse cenário reforça a importância de desenvolver métodos alternativos de produção que não dependam exclusivamente da extração de plantas ou da síntese química convencional. Nesse contexto, os estudos que exploram a produção de ácido chiquímico por meio de microrganismos representam uma abordagem promissora para atender à demanda crescente de forma mais sustentável (WU *et al.*, 2022).

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de *Paenibacillus* sp. de crescer em diferentes meios de cultivo, explorando seu potencial biotecnológico para a produção de ácido chiquímico, evidenciando sua resistência e adaptabilidade. Esses achados fortalecem a hipótese de que *Paenibacillus* sp. pode ser uma alternativa promissora para diversas aplicações biotecnológicas, especialmente em processos que demandam microrganismos robustos e metabolicamente versáteis.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTIVO

Para realização deste trabalho foram utilizados quatro meios de cultivo:

1. Meio líquido nutritivo (LB) adaptado, composto de 0,1% de NaCl, 1% de triptona, 0,5% v/v de extrato de levedura, acrescidos de ácido ferúlico 300 g L^{-1} (BERTANI, 1951);
2. Meio líquido mineral (MLM), composto de nitrato de amônio de 0,1%, sulfato de magnésio a 0,02%, cloreto de cálcio a 0,002%, fosfato de potássio dibásico a 0,1%, fosfato de potássio monobásico a 0,1% e sulfato de amônia hidratado a 0,005% v/v;
3. Horikoshi composto de peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, K_2HPO_4 0,005%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001% v/v (NAKAMURA; HORIKOSHI, 1976).
4. MLB composto de 0,1% de NaCl, 1% de triptona, 0,5% v/v de extrato de levedura, nitrato de amônio de 0,1%, sulfato de magnésio a 0,02%, cloreto de cálcio a 0,002%, fosfato de potássio dibásico a 0,1%, fosfato de potássio monobásico a 0,1% e sulfato de amônia hidratado a 0,005% v/v (BERNARDO *et al.*, 2021).

4.2 FERMENTAÇÃO DE *PAENIBACILLUS* SP. JAB-HUM

4.2.1 Pré-inóculo

Os pré-inóculos foram preparados a partir de 200 μL do estoque preservado em ultra freezer, transferidos para 35 mL de meio Horikoshi líquido, em frascos Erlenmeyers de 125 mL. As células bacterianas foram suspensas no meio e transferidas para um agitador orbital e mantidas a 30°C, a uma velocidade de agitação de 150 rpm, até atingir $\text{DO}_{600} = 0,900$, conforme padrão estabelecido. Após esse ponto, os pré-inóculos foram utilizados nas fermentações (BERNARDO *et al.*, 2021).

4.2.2 Fermentações

Para as fermentações, foram estabelecidos padrões em que o isolado foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 35 mL de seus respectivos meios. Para preparar o isolado, alíquotas de 500 μL da suspensão do pré-inóculo foram adicionadas aos meios, atingindo uma DO_{600} inicial de 0,02 em média. Posteriormente, foram incubadas em agitador orbital a 30°C, sob agitação de 150 rpm, durante 24 horas (BERNARDO *et al.*, 2021).

4.3 SCREENING PARA SELEÇÃO DE ISOLADOS BIOCONVERSORES DO ÁCIDO FERÚLICO.

Os isolados bacterianos utilizados neste trabalho foram obtidos do banco de bactérias do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas (LBMP). A biotransformação do ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol, vanilina e ácido vanílico foi realizada utilizando os meios descritos no item 4.1. O primeiro screening consistiu no cultivo de 28 isolados bacterianos por um período de 72 horas. Após esse intervalo, os produtos da fermentação foram analisados por HPLC, em amostras coletadas após 48 e 72 horas de cultivo. Nesta análise foi identificado os metabólitos de interesse, determinando, com base nos resultados obtidos, o isolado com o melhor perfil de conversão do substrato em vanilina, 4-vinilguaiacol e ácido vanílico.

4.4 HPLC - HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Para as análises de cromatografia, todas as amostras foram submetidas a um processo de diluição em água ultrapura 1:10 e, em seguida, filtradas utilizando filtros de PTFE com membrana de 0,22 µm. Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para a etapa de análise em HPLC, com o método cromatográfico que consistiu em eluição da fase móvel no modo gradiente, empregando como fases móveis: fase A (H₂O com 0,1% (volume:volume) de ácido trifluoroacético) e fase B (metanol com 0,1% (volume:volume) de ácido trifluoroacético). Nesta etapa foi empregada uma coluna de fase estacionária de octadecilsilano (C18), no equipamento marca Shimadzu modelo LC40D. A eluição da fase móvel 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). O volume de injeção foi de 20 µL com o fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e com detecção por espectrofotometria de UV-Vis (detector de arranjo de diodos) monitorando o comprimento de onda a 280 nm na quantificação dos compostos (SANTOS, et al., 2021).

4.5 SEQUENCIAMENTO SANGER (GENE 16 RRNA)

As extrações do DNA das bactérias foram realizadas utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit da Qiagen, seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), utilizando uma cuba modelo Max Cell EC 360 M e tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). O gel foi corado com safer dye (1 µl a cada 5 µl de amostra) e submetido a eletroforese por 60 minutos, com voltagem constante de 90 V. A visualização foi feita por meio de sistema de luz UV e documentada usando o GEL DOC Universal Hood II (BIO-RAD). As amostras também foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) para estimar a pureza do

DNA extraído, verificando a razão 230/260 nm (<2) e para impurezas proteicas na razão 260/280 nm (<1,7) (CORCOLL *et al.*, 2017).

A amplificação do gene 16S rRNA foi feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando oligonucleotídeos FD1 (5'-CCg AAT TCg TCg 33 ACA ACA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g - 3') e RD1 (5'-CCC ggg ATC CAA gCT TAA ggA ggT gAT CCA gCC - 3') (WEISBURG *et al.*, 1991). As reações de PCR foram feitas da seguinte maneira 20 mmol L⁻¹ de Tris-HCl; 1,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂; 5 pmol de cada oligonucleotídeo; 1,25 U de Taq polimerase fermentas e 40 ng de DNA. O DNA foi amplificado em termociclador PTC-100™ “Programmable Thermal Controller” – MJ Research, Inc. de acordo com o programa: pré-aquecimento a 95°C por 1 minuto; 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 95°C; 1 min de emparelhamento dos oligonucleotídeos a 53°C; 1 min de elongação a 72°C e 5 min de etapa de extensão final a 72°C. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit “DNA Clean & Concentrator™ -5” Zymo Research.

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizado na plataforma ABI 3130xl, o protocolo da reação de sequenciamento foi realizado de acordo com o descrito pelo fabricante do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, utilizando-se para isso os primers FD1, RD1 e os internos 8f, 362f, 786f, 907r e 1203f segundo Inui *et al.* (2012).

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências foram analisadas com o programa “Phred/ Phrap/Consed” (GORDON *et al.*, 1998). As sequências com mais de 400 bases e com qualidade Phred acima de 20 foram selecionadas, com auxílio do programa Contgen. As sequências em formato fasta foram comparadas com sequências do GenBank utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e também analisadas no banco Ribossomal Database Project (RDP).

4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Foram selecionadas 149 sequências de 16S rRNA de diferentes espécies de *Paenibacillus*, incluindo três cepas distintas de *Paenibacillus alvei*, além de um grupo externo composto por *Escherichia coli*. O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado utilizando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) parâmetros padrão e um bootstrap de 1000 para garantir maior confiabilidade na análise. As sequências alinhadas foram empregadas na construção da árvore filogenética por meio do servidor web IQ-TREE (<http://www.iqtree.org/>). A árvore de consenso gerada foi posteriormente visualizada e editada no iTOL (Interactive Tree of Life) (<https://itol.embl.de/>) (LETUNIC; BORK, 2024), permitindo uma representação clara das relações filogenéticas entre as espécies analisadas.

4.8 TESTE DE CULTIVO POR 120 HORAS.

Os 28 isolados bacterianos foram cultivados por 120 horas em MLM acrescido com glicose 500 g L⁻¹ e ácido ferúlico 300 gL⁻¹, coletando alíquotas a cada 24 horas utilizando dois controles: um sem inoculação das bactérias no meio com ácido ferúlico (controle abiótico) e outro com inoculação das bactérias, mas sem adição de ácido ferúlico (controle biótico) e avaliado o crescimento bacteriano medindo-se a DO₆₀₀, além da análise de HPLC.

4.9 CURVA DE CRESCIMENTO

O isolado bacteriano escolhido JAB-Hum foi cultivado por 24 horas nos meios Horikoshi, MLM e MLB, com coleta de alíquotas a cada 4 horas. Além disso, foi utilizado um controle abiótico (meio sem a presença de bactérias). A velocidade de crescimento bacteriano foi avaliada por meio da medida da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀).

4.9.1 Unidades Formadoras De Colônias (UFC)

Para realizar a contagem de células e a análise adequada, utilizou-se a câmara de Neubauer, para contagem celular. O procedimento foi realizado com o auxílio de microscópio óptico Biológico Binocular, Série NOVA 180, utilizando objetiva de 100x (Guerra, 2016). O preparo da amostra consistiu-se em coletar 1 mL da amostra a ser analisada, diluir a amostra 25 vezes, homogeneizar e, em seguida, diluir na proporção de 1:1 com azul de metileno. Após homogeneização, foi transferida uma alíquota para a câmara de Neubauer, de modo que toda a superfície da leitura fosse coberta. Os cálculos foram realizados conforme descrito por Guerra, (2016).

4.9.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada por meio da contagem de células viáveis utilizando a câmara de Neubauer. As amostras foram previamente diluídas devido à sua alta concentração e, em seguida, coradas com azul de metileno na proporção 1:1. O cálculo utilizado foi: Viabilidade (%) = (células vivas / total de células) x 100, sendo o resultado expresso em porcentagem (GIACON *et al.*, 2022).

4.10 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

Após o cultivo, o nível de expressão de proteínas foi analisado por SDS-PAGE, conforme o método descrito por Laemmli (1970). Para isso, os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em um gel de poliacrilamida a 12,5%, utilizando um sistema de tampão SDS 1x composto por glicina 14,4g/L; Tris-Base 3 g/L; SDS 1g/L, para garantir a separação eficiente das

proteínas de acordo com seu peso molecular. Após a corrida eletroforética, as bandas proteicas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250, permitindo a identificação e comparação dos perfis de expressão proteica entre as amostras analisadas.

4.11 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ÁCIDO FERÚLICO

Foi realizado teste de tolerância para o isolado, adicionando ácido ferúlico no cultivo em meio Horikoshi, para que a única fonte de estresse fosse as concentrações do ácido ferúlico, nas diferentes concentrações de ácido ferúlico: 100, 200, 300, 400, 500 e 600 g L⁻¹. Os cultivos foram mantidos a 30 °C sob agitação a 150 rpm e a fermentação foi realizada por 24 horas, a cada 4 horas uma alíquota de 1 mL era retirada do meio para análise dos metabolitos. Foram utilizados dois controles: C1: sem inoculação das bactérias no meio com ácido ferúlico (controle abiótico) e C2: com inoculação das bactérias, mas sem adição de ácido ferúlico (controle biótico). A velocidade de crescimento bacteriano foi avaliada por meio da medida da densidade óptica a 600nm (DO₆₀₀) utilizando-se espectrofotômetro ASKO V1200. Em seguida foi realizada uma análise por HPLC, como descrita acima, para avaliar a produção de metabolitos.

4.12 AVALIAÇÃO DE NUTRIENTES

Nos testes de avaliação de nutrientes utilizando o meio Horikoshi, foram alternadas a presença e a ausência das fontes de carbono, peptona e extrato de levedura. Nesse experimento, a velocidade de crescimento bacteriano foi avaliada por meio da medida da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) em um espectrofotômetro ASKO V1200. Na sequência, a mesma análise por HPLC foi realizada visando avaliar se houve diferença na produção de metabolitos nas diferentes fontes de carbono.

4.13 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

4.13.1 Análise do extrato fermentativo por RMN de ¹H

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H) foram adquiridos e processados a fim de caracterizar o ácido chiquímico. O extrato fermentado por 6 horas foi centrifugado a 10.000 xg por 5 minutos a 20°C, para a remoção de sólidos e resíduos em suspensão. Em seguida, o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido, para preservar suas características estruturais. Após o congelamento, a amostra foi liofilizada por 24 horas a uma temperatura de -50°C, utilizando o liofilizador modelo L101, da marca Liobras, e posteriormente foi dissolvida em solução de água deuterada (D₂O). Esta amostra foi então analisada em um

espectrômetro de RMN da marca Bruker operando a 400 MHz. Os dados foram coletados utilizando um pulso de 90 graus e um tempo de aquisição de 5.45 segundos, e posteriormente processados aplicando um filtro de Lorentziano para correção da linha de base. A metodologia empregada permitiu a obtenção de espectros de alta qualidade, os quais foram cruciais para a elucidação da estrutura molecular do ácido chiquímico. Para análise dos resultados e construção dos espectros foram utilizados os software TopSpin.

4.13.2 Análise do extrato fermentativo por RMN de ^{13}C

A amostra de ácido chiquímico foi dissolvida em água deuterada (D_2O) e analisada por ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C) em um espectrômetro Bruker Avance III de 400 MHz. Os espectros foram adquiridos utilizando um pulso de 90° , tempo de relaxação de 1 segundo e número de varreduras de 1024. Os dados foram processados utilizando o software TopSpin, incluindo correção de linha de base e fase.

4.13.3 Caracterização química do Ácido Chiquímico

Para avaliação e comparação dos resultados obtidos das análises de RMN, foram realizadas buscas por trabalhos que apresentassem espectros referente a caracterização do ácido chiquímico em plantas e/ou microrganismos produtores. Para caracterização do ácido chiquímico também foi levado em consideração espectros de amostras puras obtidas do SDBS – Spectral Database for Organic Compounds (<https://sdb.sdb.aist.go.jp/>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Após esse primeiro cultivo, os isolados bacterianos testados seguiram para sequenciamento do gene 16S rRNA para identificar os gêneros estudados (Tabela 3). As análises filogenéticas realizadas a partir do gene 16S rRNA contra o banco de dados NCBI RefSeq Targeted Loci Database for 16S rRNA gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/>) que permitiram identificar os isolados a nível de gênero. O isolado selecionado para os demais testes de conversão pertence ao gênero *Paenibacillus* sp. (JAB-Hum).

Tabela 3. Identificação dos gêneros bacterianos por sequenciamento do gene 16S rRNA

Código	Gênero
<i>Bacillus</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>P. cepacia</i>	<i>Bacillus</i>
<i>PseudomonaS</i>	<i>Bacillus</i>
AmiP	<i>Prescottella</i>
As1-111	<i>Azosp.irillum</i>
Abv5	<i>Paraburkholderia</i>
R.3.21	<i>Burkholderia</i>
B-2.8	<i>Klebsiella</i>
De 7	<i>Bacillus</i>
JAB-Hum	<i>Paenibacillus</i>
I 2	<i>Enterobacter</i>
msa	<i>Bacillus</i>
Bbi 298	<i>Bacillus</i>
Nem7	<i>Klebsiella</i>
De 14	<i>Paraburkholderia</i>
Isol c	<i>Burkholderia</i>
Usc 8	<i>Paraburkholderia</i>
Bbi 290	<i>Bacillus</i>
Bbi 320	<i>Bacillus</i>
Cana 6	<i>Bacillus</i>
De 15	<i>Bacillus</i>
Bbi 309	<i>Bacillus</i>
De 11	<i>Klebsiella</i>
Bbi 274	<i>Klebsiella</i>
Bbi 248	<i>Pantoea</i>
Bbi 287	<i>Klebsiella</i>
De 12	<i>Paenibacillus</i>
De 13	<i>Paraburkholderia</i>

A Figura 3 apresenta o resultado obtido na análise de identificação realizada por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Esta análise permitiu a comparação da sequência obtida com outras disponíveis em bancos de dados, confirmando que o isolado JAB-Hum pertence ao gênero *Paenibacillus* sp. Onde a sequência analisada foi:

Figura 3. Análise de identificação da sequência genética realizada por meio da ferramenta BLAST, confirmando a classificação do isolado JAB-Hum como pertencente ao gênero *Paenibacillus* sp.

RID [T1TSRVZA013](#) Search expires on 01-23 19:39 pm [Download All](#) ▼

Results for

Program [BLASTN](#) [Citation](#) ▼

Database [rRNA_typestrains/16S_ribosomal_RNA](#) [See details](#) ▼

Query ID [131Query_1316323](#)

Description [ISO_1](#)

Molecule type [dna](#)

Query Length [1531](#)

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

[+ Add organism](#)

Percent Identity to

E value to

Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 10 ▼ [?](#)

☒ select all 10 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Paenibacillus alvei DSM 29 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus alvei DSM 29	2695	2695	98%	0.0	99.00%	1527	NR_042091.1
☒	Paenibacillus alvei strain NBRC 3343 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus alvei	2636	2636	96%	0.0	98.98%	1476	NR_113577.1
☒	Paenibacillus apiarius strain DSM 5581 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus apiarius	2508	2508	99%	0.0	96.62%	1531	NR_040890.1
☒	Paenibacillus profundus strain SI 79 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus profundus	2481	2481	98%	0.0	96.47%	1515	NR_132304.1
☒	Paenibacillus aquistagni strain 11 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus aquistagni	2447	2447	96%	0.0	96.55%	1478	NR_152638.1
☒	Paenibacillus taiwanensis strain BCRC 17411 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus taiwanensis	2446	2446	99%	0.0	95.91%	1537	NR_044007.1
☒	Paenibacillus lutimneralis strain MBLB1234 16S ribosomal RNA, complete sequence	Paenibacillus lutimneralis	2396	2396	99%	0.0	95.20%	1562	NR_165675.1
☒	Paenibacillus lutimneralis strain MBLB1234 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus lutimneralis	2396	2396	99%	0.0	95.20%	1562	NR_165674.1
☒	Paenibacillus marinisediminis strain LHW35 16S ribosomal RNA, partial sequence	Paenibacillus marinisediminis	2392	2392	96%	0.0	95.94%	1482	NR_132694.1
☒	Paenibacillus lutimneralis strain MBLB1234 16S ribosomal RNA, complete sequence	Paenibacillus lutimneralis	2390	2390	99%	0.0	95.13%	1562	NR_165673.1

Com base nos resultados da análise BLAST, a sequência examinada apresenta 99% de identidade e 98% de cobertura em relação a um *Paenibacillus alvei*, cuja identificação também foi baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA.

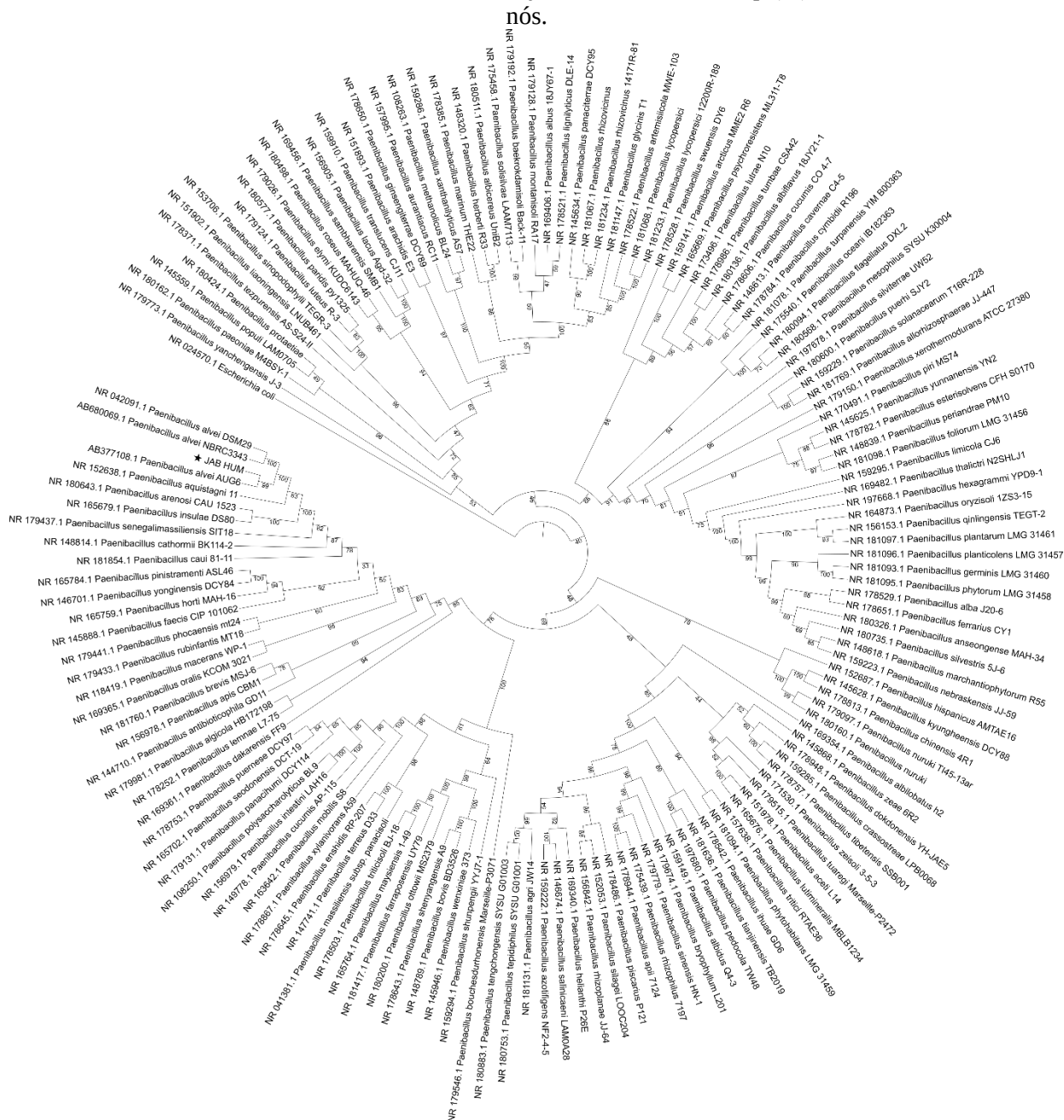
5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A partir dos resultados de sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados, foi realizada a análise filogenética para sua identificação. Utilizando a ferramenta BLAST, as sequências foram comparadas com o banco de dados, permitindo a identificação dos isolados com base na maior similaridade observada para cada sequência analisada. Adicionalmente, foi construída uma árvore

filogenética baseada no método de máxima verossimilhança, com suporte estatístico obtido por meio de 1000 replicações bootstrap, garantindo maior confiabilidade nos agrupamentos gerados. Os IDs das sequências obtidas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizadas para a construção da árvore filogenética, estão disponíveis no Apêndice 1.

Para o isolado JAB-Hum analisado neste estudo, a análise filogenética confirmou sua classificação no gênero *Paenibacillus* sp. (Figura 4), amplamente reconhecido por seu papel na produção de compostos fenólicos (LIU et al., 2020).

Figura 4. Árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA do isolado JAB-HUM, construída utilizando o método de máxima verossimilhança. Os valores bootstrap (%) são indicados nos nós.



No mesmo nó que o isolado JAB-Hum está o *Paenibacillus alvei* que é amplamente reconhecido por suas aplicações industriais devido à sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, compostos antimicrobianos e outras biomoléculas de interesse comercial (PRANAV et al., 2021). A análise filogenética revelou uma alta similaridade entre o isolado JAB-Hum e *P. alvei* cepa AUG6 (NCBI ID: AB377108.1), sugerindo que o isolado pode apresentar características metabólicas e fisiológicas semelhantes. Essa relação filogenética indica um potencial biotecnológico relevante, tornando o isolado JAB-Hum um possível candidato para aplicações em processos industriais e agrícolas, como biodegradação e controle biológico (MARKAKIS et al., 2016).

Além disso, *P. alvei* é uma espécie versátil encontrada em diversos habitats, incluindo solos diversos (MARKAKIS et al., 2016) e colônias de abelhas (*Apis mellifera*), onde pode desempenhar um papel na microbiota associada às colmeias (DJORDJEVIC et al., 2000). Essa ampla distribuição reforça sua capacidade de adaptação e seu potencial para aplicações biotecnológicas variadas.

5.3 SCREENING PARA SELEÇÃO DE ISOLADOS BIOCONVERSORES DO ÁCIDO FERULICO

Uma seleção (screening) foi realizada com o objetivo de avaliar a capacidade de 28 isolados bacterianos, selecionados do banco de isolados do LBMP, em converter o ácido ferúlico em 4-vinilguaiaicol, vanilina ou ácido vanílico.

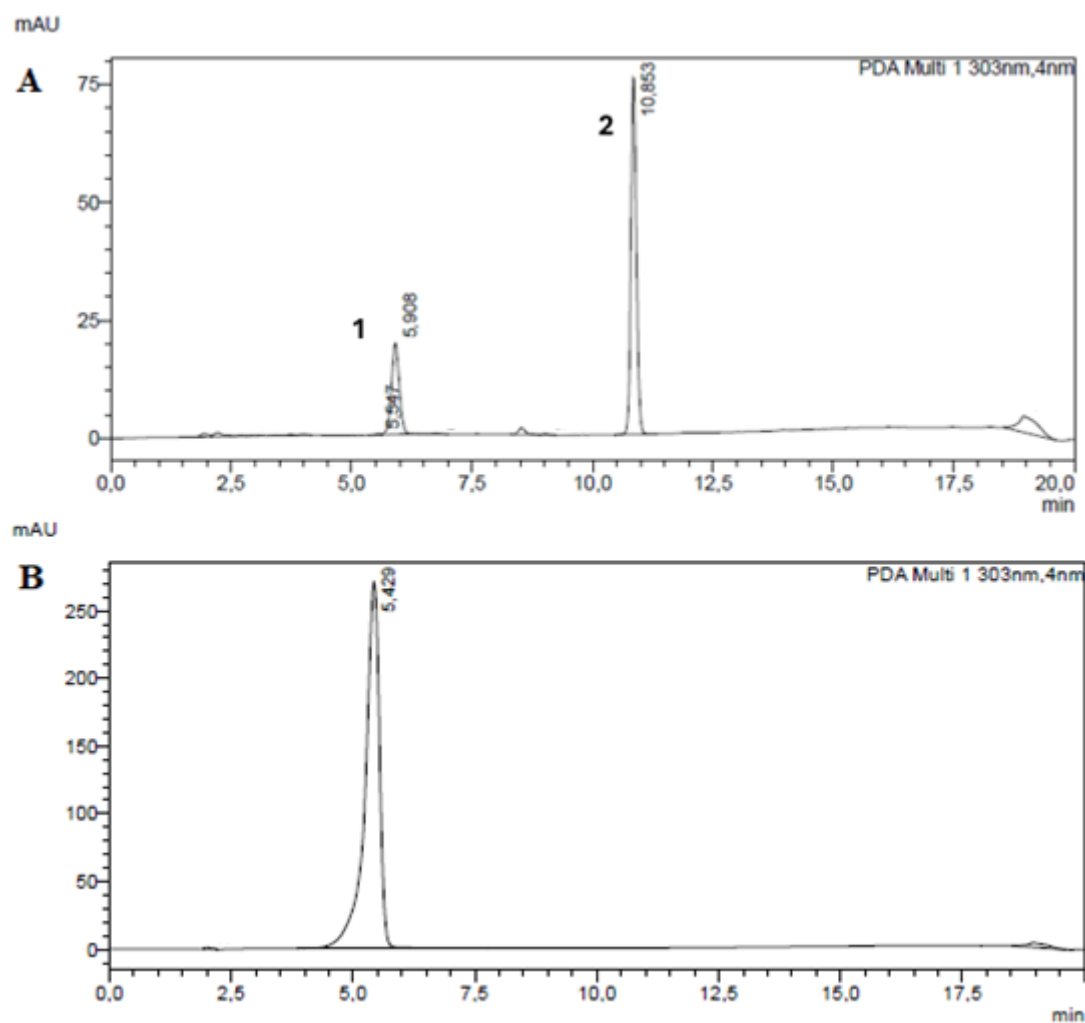
Na Tabela 3, são apresentados os isolados que foram estudados e que apresentaram capacidade de converter o ácido ferúlico em 4-vinilguaiaicol, vanilina ou ácido vanílico, esta análise foi realizada em HPLC. Esse experimento gerou dados exclusivamente qualitativos, sem quantificação. Com base nessas análises, foi selecionado um isolado denominado JAB-Hum, que mostrou capacidade hipotética de bioconverter ácido ferúlico em vanilina (Figura 5).

A análise de HPLC demonstrou que vários isolados estudados (Tabela 4) possuem a capacidade de bioconverter o ácido ferúlico em diferentes compostos fenólicos. Dentre os compostos obtidos, apenas o isolado JAB-HUM converteu o ácido ferúlico em vanilina. A vanilina se destaca por sua ampla aplicação em diversas indústrias, como alimentos, bebidas e cosméticos, devido ao seu aroma característico e sua versatilidade. Este composto, que faz parte da rota metabólica do ácido ferúlico, é altamente valorizado no mercado (LUZIATELLI et al., 2019). Com base nessa relevância, o isolado *Paenibacillus* sp. (JAB-Hum) foi selecionada para os testes subsequentes, visando explorar seu potencial biotecnológico na conversão do ácido ferúlico.

Tabela 4. Capacidade de bioconversão das bactérias testadas em relação aos compostos ácido ferúlico, 4-vinilguaiacol, vanilina e ácido vanílico. Os espaços vazios indicam que o isolado não foi capaz de produzir o respectivo composto, enquanto os "X" indicam que o isolado foi capaz de produzi-lo.

Código	4-Vinilguaiacol	Vanilina	Ácido vanílico
<i>Bacillus</i>	X		
<i>P. cepacia</i>			
<i>PseudomonaS</i>	X		
AmiP	X		
As1-111	X		
Abv5			
R.3.21	X		
B-2.8	X		
De 7			
JAB-Hum		X	
I 2	X		
msa			
Bbi 298	X		
Nem7	X		
De 14			X
Isol c	X		
Usc 8	X		
Bbi 290	X		
Bbi 320	X		
Cana 6			
De 15	X		
Bbi 309	X		
De 11	X		
Bbi 274	X		
Bbi 248	X		
Bbi 287	X		
De 12			
De 13			

Figura 5. Cromatograma obtido por HPLC para o isolado bacteriano *Paenibacillus* sp. (JAB-Hum). (A) Cromatograma da amostra fermentada, com os picos identificados: 1 – vanilina e 2 – ácido ferúlico. (B) Cromatograma do padrão de vanilina utilizado como referência.



A análise cromatográfica permitiu a avaliação qualitativa dos compostos presentes no meio de cultivo, com destaque para a comparação entre os tempos de retenção das amostras e o padrão de vanilina. Embora a quantificação não tenha sido realizada, a identificação de picos com tempos de retenção semelhantes ao do padrão sugere a possível presença de compostos relacionados.

Com base nos resultados obtidos, novos ensaios foram realizados para aprofundar o entendimento sobre o comportamento metabólico do isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum. Inicialmente, o isolado foi cultivado por 120 horas em meio MLM, com a coleta de alíquotas a cada 24 horas para avaliar a velocidade de crescimento celular por densidade óptica a 600_{nm} (D.O 600_{nm}) e quantificar os metabólitos de interesse por meio de HPLC.

Posteriormente, foram realizados experimentos de cultivo em meio MLM por 24 horas, com coleta de alíquotas a cada 2 horas para determinar o momento em que o ácido ferúlico poderia ser convertido em vanilina pelo isolado JAB-Hum. Esses ensaios incluíram a análise dos metabólitos produzidos, utilizando HPLC como técnica principal.

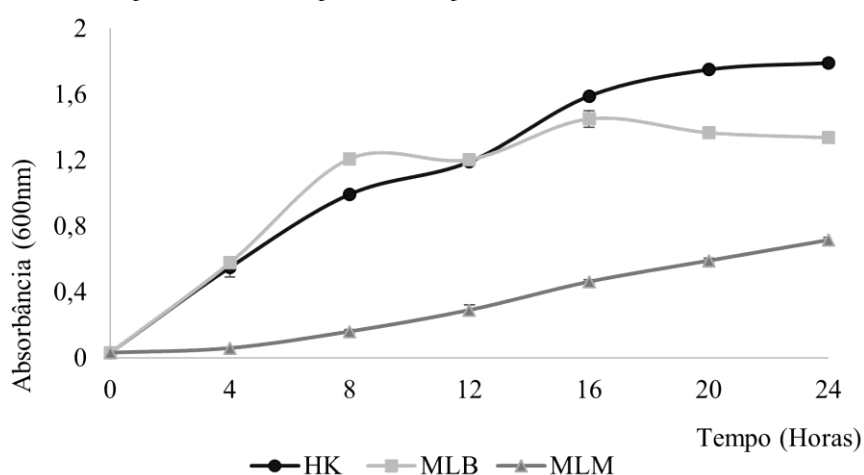
Adicionalmente, testes de tolerância em meio LB foram conduzidos para investigar o impacto de altas concentrações de ácido ferúlico no crescimento bacteriano. O crescimento celular foi monitorado por D.O.⁶⁰⁰, avaliando a capacidade do isolado bacteriano de crescer sob condições de estresse induzido pelo substrato. A conversão do ácido ferúlico em compostos fenólicos de interesse, como a vanilina, também foi analisada por HPLC.

Os resultados das análises de HPLC foram negativos, demonstrando que o isolado *Paenibacillus* sp. JAB-Hum não possui a capacidade de bioconverter ácido ferúlico em vanilina ou outros compostos fenólicos. Apesar disso, para ampliar a compreensão sobre o potencial metabólico da bactéria e validar os resultados, novos experimentos foram realizados, incluindo o uso de diferentes meios de cultivo.

5.4 CURVA DE CRESCIMENTO

Após os experimentos qualitativos, realizou-se um teste de crescimento utilizando os meios MLM, MLB e Horikoshi. Os resultados indicaram que, no meio MLM, o desenvolvimento da bactéria foi inferior em comparação aos outros meios testados. Por outro lado, nos meios MLB e Horikoshi, o crescimento bacteriano foi bastante similar (Figura 6).

Figura 6. Curva de crescimento celular em meio Horikoshi, MLB e MLM. A absorbância foi medida por densidade óptica em espectrofotômetro a 600nm.

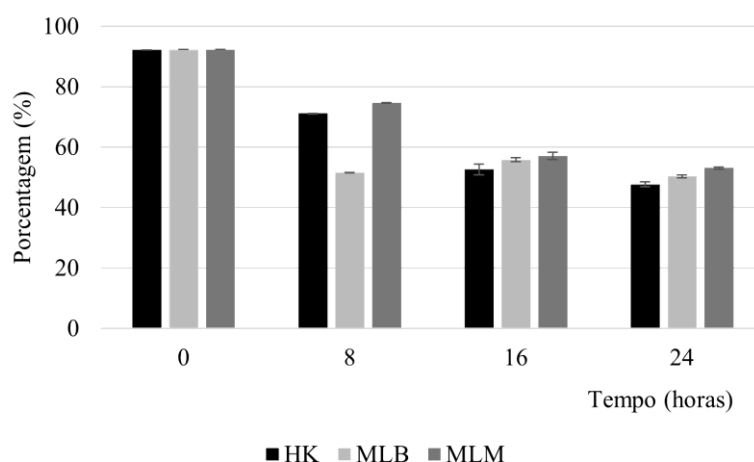


Com base nesses resultados e na comparação com outros estudos descritos na literatura, como o de Bernardo et al. (2021), que observou a capacidade de crescimento de alguns isolados

bacterianos no meio MLB, e conforme apontado por Marcus (2001), o gênero *Paenibacillus* sp. é capaz de crescer em diferentes fontes de carboidratos, incluindo meios mínimos contendo glicose. Esses achados corroboram os resultados obtidos neste trabalho.

Foram realizados testes de viabilidade celular nos três meios avaliados (Figura 7). Os resultados mostraram que, com o decorrer do tempo, houve uma redução gradual na viabilidade celular, acompanhando o comportamento observado nos testes de crescimento. Após 8 horas de cultivo, as bactérias começaram a entrar na fase estacionária, indicando um declínio no crescimento ativo.

Figura 7. Viabilidade celular do *Paenibacillus* sp. JAB-Hum em diferentes meios de cultivo ao longo do tempo. Os resultados são apresentados como porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células em cada ponto temporal. As barras representam a média de três experimentos independentes, e as linhas de erro indicam o desvio padrão para cada meio de cultivo.



O declínio na viabilidade celular pode ser atribuído a combinação de fatores fisiológicos, metabólicos e ambientais. Esses fatores interagem de forma complexa, resultando em um ambiente desfavorável para a continuidade do crescimento bacteriano, como a exaustão de nutrientes essenciais, alterações no pH, maior competição por recursos limitados, como nutrientes, espaço dentre outros (CARVALHO, 2010).

A fim de avaliar a capacidade de formação de colônias, foi realizada a contagem de UFC para cada meio de cultivo, expressa em células por mL nos tempos de 0, 8, 16 e 24 horas (Tabela 5).

Tabela 5. Viabilidade Celular (UFC/mL) nos Meios de Cultivo em Diferentes Intervalos de Tempo.

Tempos	Horikoshi	MLB	MLM
0	3,02E+08 ± 0	3,02E+08 ± 0	3,2E+08 ± 0
8	3,05E+08 ± 0,08	3,13E+08 ± 0,15	2,65E+08 ± 0,32
16	2,98E+08 ± 0,17	2,90E+08 ± 0,01	2,53E+08 ± 0,19
24	2,48E+08 ± 0,16	2,74E+08 ± 0,46	2,40E+08 ± 0,18

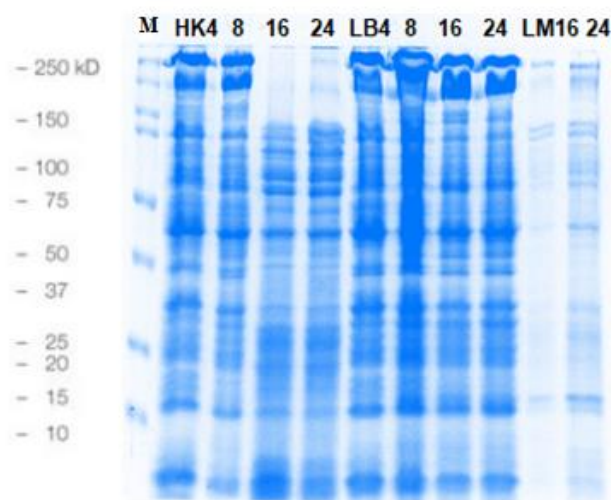
Ao longo das horas de cultivo, tanto a viabilidade celular quanto a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) diminuem, o que explica a fase estacionária na curva de crescimento. Esse comportamento indica que, no final das fermentações, há uma redução no número de células viáveis, resultando em uma menor densidade populacional de células ativas. Essa queda pode estar associada ao esgotamento de nutrientes essenciais, ao acúmulo de subprodutos tóxicos ou às mudanças nas condições do meio, que dificultam a sobrevivência das células e afetam a eficiência do processo fermentativo (FORSGREN et al., 2008).

Apesar dessas limitações no cultivo, o metabolismo celular continua sendo fundamental para a produção de moléculas de interesse, mediado principalmente pela ação das enzimas. Estas desempenham um papel central no metabolismo celular, atuando como catalisadores biológicos que aceleram reações químicas específicas e permitem o funcionamento eficiente das vias metabólicas. Essas vias são redes de reações interligadas, responsáveis pela produção de compostos essenciais, como o ácido chiquímico, a partir de precursores simples. A regulação enzimática dessas rotas metabólicas não só garante a produção de moléculas de interesse, mas também possibilita o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para otimizar processos de síntese industrial (MALHEIROS, 2006).

Nesse contexto, compreender o perfil de expressão de proteínas envolvidas nos processos metabólicos é essencial para elucidar as etapas que influenciam a síntese de compostos de interesse. Para investigar essa expressão durante a fermentação, foi realizada uma análise por eletroforese SDS-PAGE utilizando as células obtidas em diferentes tempos de cultivo, seguidos de sonicação (Figura 8). Nos meios Horikoshi e MLB, as células analisadas corresponderam aos tempos de 4, 8, 16 e 24 horas de cultivo, enquanto, no meio MLM, foram avaliados nos tempos de 16 e 24 horas, devido à ausência de células nos tempos de 4 e 8 horas de cultivo.

Na análise do perfil de expressão de proteínas presentes na célula, após a lise da membrana, revelou a presença de proteínas com diferentes massas moleculares. Esse resultado indica que o isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum, quando fermentado em diferentes meios, apresenta perfis distintos de expressão de proteínas, de acordo com o meio utilizado, como demonstrado na Figura 8.

Figura 8. Gel de acrilamida 10% SDS – Page, contendo amostras provenientes da célula do cultivo. Canaletas: M– marcador de massa molecular (“Precision Plus Protein Dual Color Standards” – BioRad); HK – Horikoshi; LB – MLB; LM-MLM; 4, 8, 16 e 24 horas de cultivo.



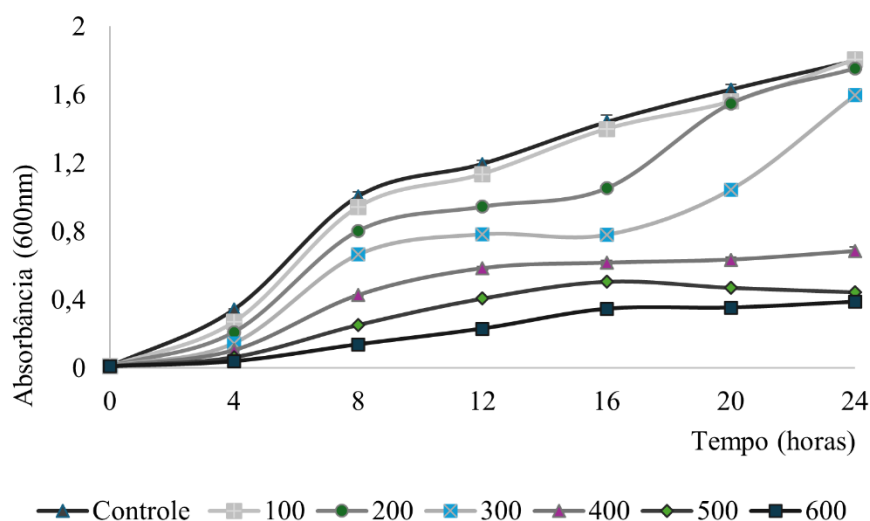
A Figura 8 mostra que, no meio Horikoshi, o perfil de expressão de proteínas é o mesmo nos tempos de 4 e 8 horas, porém, em 16 e 24 horas, esse perfil apresenta alterações. Essa característica não foi observada nos extratos que foram coletados com os meios MLB e MLM. A diferença no perfil de expressão de proteínas no meio Horikoshi sugere a hipótese de que essa existe uma regulação devido a constituição do meio que faz com que o perfil de expressão de proteínas seja diferente (MIR *et al.*, 2015).

Com esses resultados, o presente trabalho discute não apenas a produção do ácido chiquímico, mas também a possibilidade de seu acúmulo, devido à regulação de sua via metabólica. Tal regulação pode ser influenciada pela utilização do meio Horikoshi, que possivelmente afeta a expressão ou a inibição de enzimas envolvidas na via metabólica do corismato.

5.5 TESTE DE TOLERÂNCIA

Para a realização do teste de tolerância, optou-se pelo meio Horikoshi, de modo que a única fonte de estresse fosse a concentração de ácido ferúlico. Além disso, esse meio foi escolhido por já se conhecer as fases de crescimento da bactéria, o que permitiu um controle mais preciso das condições experimentais. Os resultados obtidos indicam que a bactéria foi capaz de crescer na concentração de 100 mg/L de ácido ferúlico (Figura 9), sugerindo que essa seria a melhor concentração a ser testada nos demais experimentos, no entanto, para as concentrações de 200 e 300 mg/L, embora a quantidade de substrato adicionada ao meio não tenha sido limitante, o desenvolvimento da bactéria foi mais lento. Para as concentrações de 400, 500 e 600 mg/L, a quantidade de substrato foi, de fato, limitante, o que comprometeu o crescimento da bactéria.

Figura 9. Densidade óptica do isolado JAB-Hum em resposta às concentrações de ácido ferúlico (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg L⁻¹). As leituras de absorbância foram realizadas a 600 nm utilizando espectrofotometria.



Em comparação com outros microrganismos, como *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens*, ambas as bactérias foram descritas como capazes de crescer em concentrações de até 0,5mg/mL de ácido ferúlico (LEMOS *et al.*, 2014). Já a bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi capaz de crescer na presença de até 400 mg/L de ácido ferúlico, sendo inibida em concentrações superiores (BERNARDO *et al.*, 2021). Por outro lado, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Ruminococcus albus* foram capazes de crescer em uma concentração de 970 mg/L de ácido ferúlico com até 5 dias de cultivo (CHESSON *et al.*, 1982). De acordo com a literatura, *Paenibacillus* demonstrou a capacidade de crescer em uma concentração de 1 mg/mL, evidenciando sua resistência e adaptabilidade em condições específicas (TICONA *et al.*, 2021).

A bioconversão do ácido ferúlico em compostos de valor agregado pode ser realizada por meio de rotas biológicas (Li, Long e Ding, 2020). Diversos grupos microbianos são capazes de converter o ácido ferúlico em diferentes produtos; alguns desses microrganismos apresentam grande versatilidade metabólica, conseguindo utilizar compostos aromáticos em altas concentrações como única fonte de carbono (Paz *et al.*, 2019).

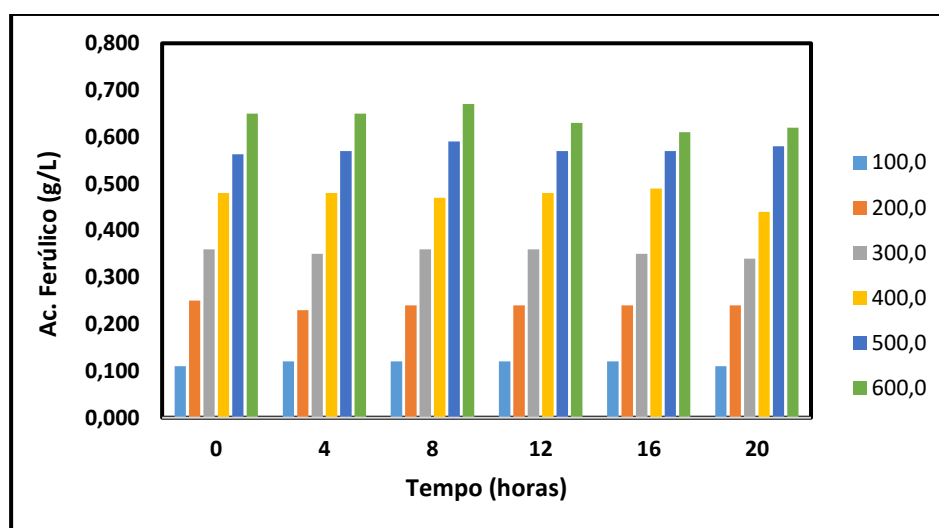
Ao analisar os produtos da fermentação por HPLC, observou-se que, para todas as concentrações testadas, nenhum dos compostos de interesse, vanilina ou ácido vanílico, foi detectado em níveis superiores aos ruídos, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Quantificação de vanilina e ácido vanílico produzidos ao longo de 20 horas de fermentação.

Vanilina			Ac. Vanílico		
Tempo (horas)	Controle	100;200;300; 400;500;600 (mg/mL)	Tempo (horas)	Controle	100;200;300; 400;500;600 (mg/mL)
0	0,083	0,083	0	0,083	0,084
4	0,083	0,083	4	0,083	0,084
8	0,083	0,083	8	0,083	0,084
12	0,083	0,083	12	0,083	0,084
16	0,083	0,083	16	0,083	0,084
20	0,083	0,083	20	0,083	0,084

A quantificação do ácido ferúlico revelou que, mesmo após 20 horas de fermentação, não houve bioconversão em nenhuma das concentrações testadas (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg/L), conforme ilustrado na Figura 10. A concentração inicial de ácido ferúlico permaneceu constante durante todo o processo fermentativo, indicando a ausência de bioconversão do ácido ferúlico nos compostos de interesse. Esse resultado sugere a hipótese de que o isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum não possui ativação das rotas metabólicas envolvidas na degradação do ácido ferúlico.

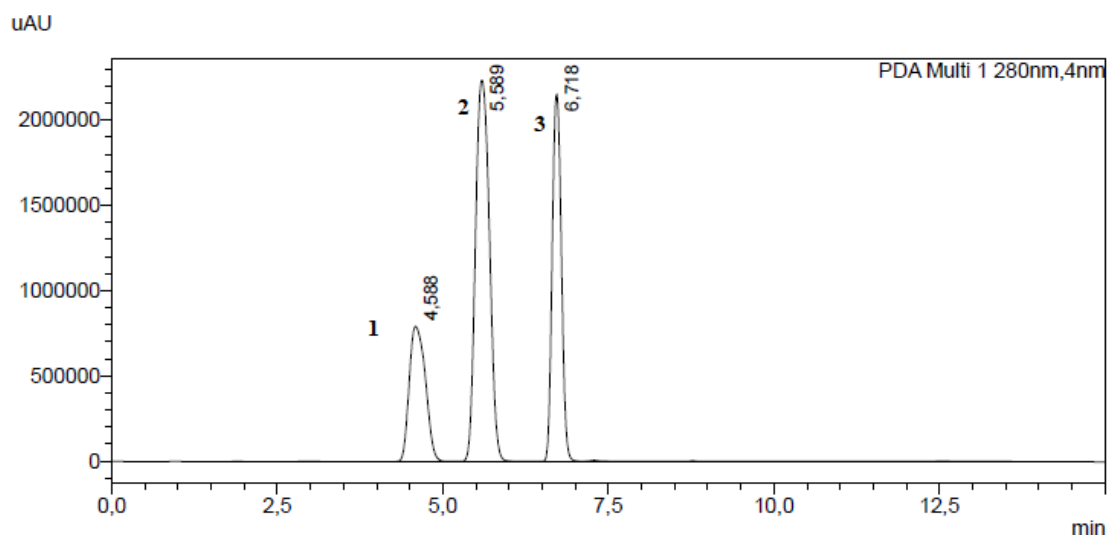
Figura 10. Quantificação do ácido ferúlico por HPLC ao longo das 20 horas de fermentação. As concentrações testadas para a tolerância do isoaldo de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum foram 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg/L.



No entanto, foi possível observar no cromatograma um pico com tempo de retenção entre 1,8 e 2,0 minutos, que não corresponde a nenhum dos metabólitos esperados, conforme verificado nos padrões de ácido vanílico e vanilina (Figura 11). Além disso, nenhum dos metabólitos

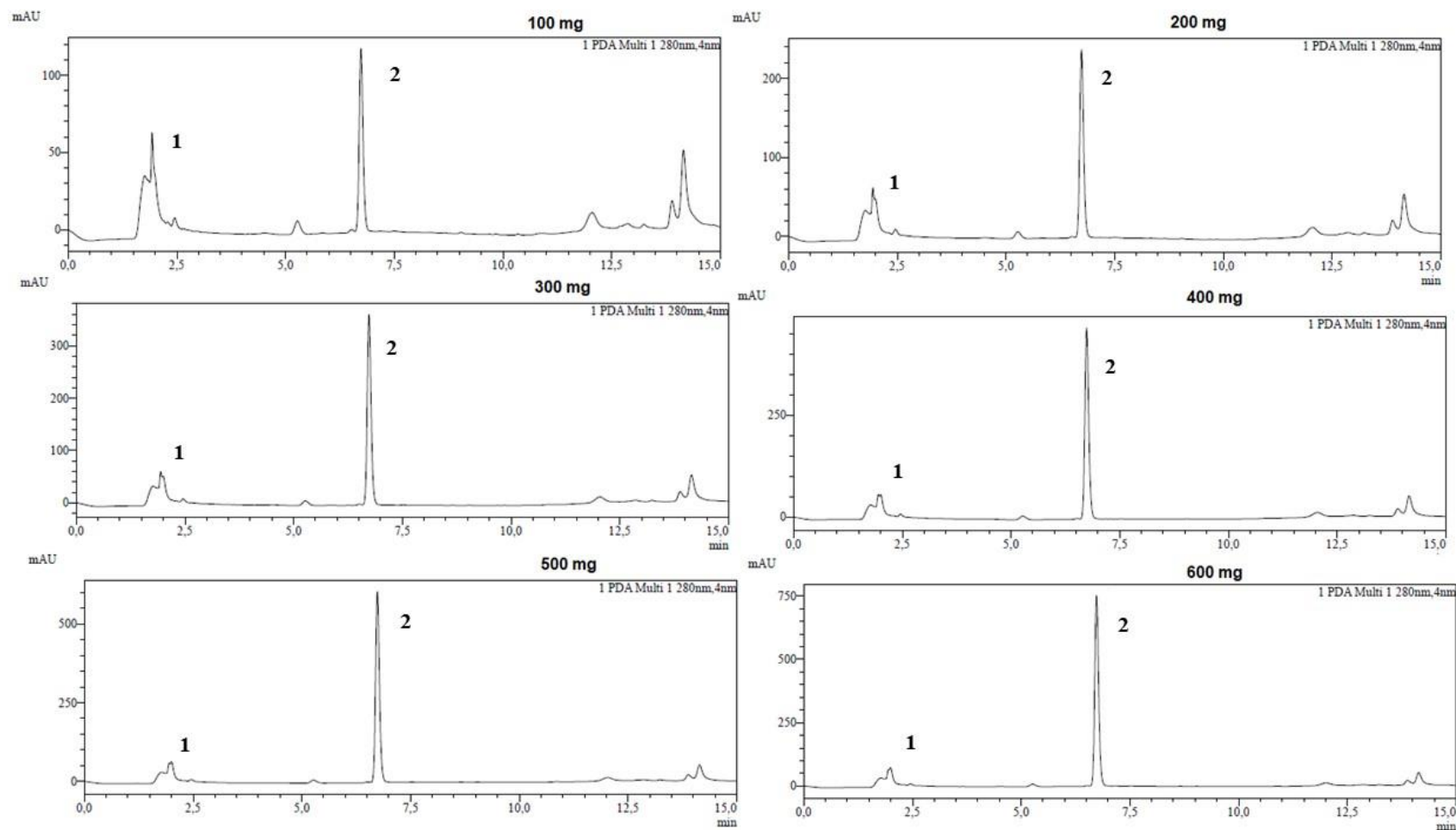
esperados foi identificado nas amostras ao serem comparados com os tempos de retenção dos padrões analíticos.

Figura 11. Cromatograma obtido por HPLC para os padrões de conversão do ácido ferúlico. (1 – ácido vanílico, 2 – vanilina e 3 – ácido ferúlico).



Esse resultado sugere a presença de um possível composto desconhecido (Figura 12), destacando a necessidade de uma investigação mais aprofundada. Para uma identificação mais precisa, é fundamental realizar comparações com padrões adicionais, novas análises por HPLC e abordagens não direcionadas. Além disso, a comparação desses resultados com o perfil obtido por SDS-PAGE revela diferenças na expressão proteica, que podem estar associadas à produção desse composto. Esse aspecto é particularmente relevante, pois, no meio Horikoshi, os perfis de expressão variam ao longo dos tempos de 4, 8, 16 e 24 horas (Figura 8). Diante disso, foi essencial buscar na literatura estudos que apresentem perfis cromatográficos semelhantes e utilizem condições analíticas comparáveis, a fim de embasar a interpretação dos dados e direcionar futuras análises.

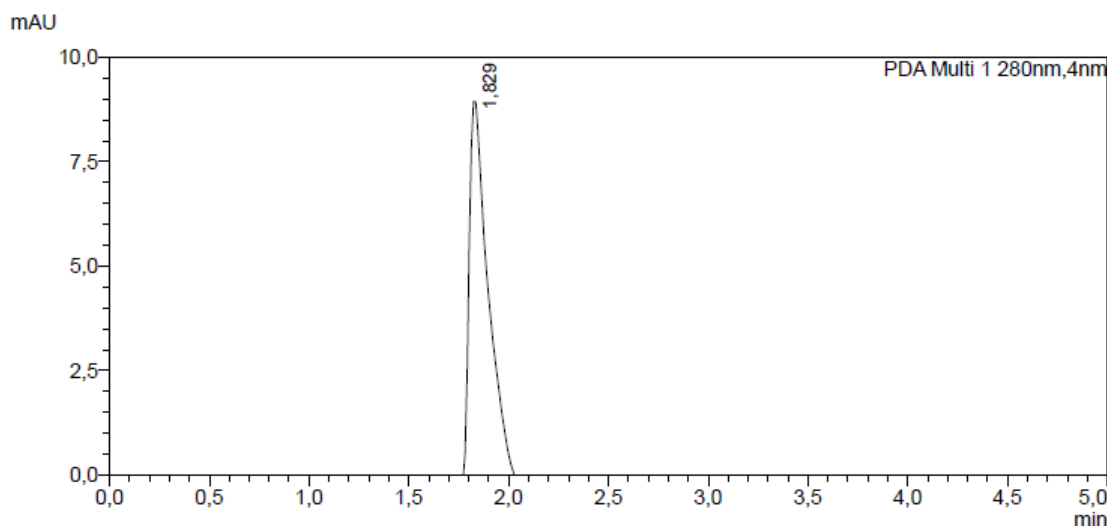
Figura 12. Cromatograma obtido por HPLC para o tempo de 8 horas de cultivo nas concentrações de ácido ferúlico de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg L⁻¹. O pico 1 corresponde ao composto a ser investigado com tempo de retenção de 1,8 minutos, enquanto o pico 2 representa o ácido ferúlico com 6,7 minutos.



Com base no perfil cromatográfico obtido, e em comparação a literatura de Santos (2009), a melhor hipótese elaborada, é de que o pico observado no cromatograma corresponde ao ácido chiquímico. O estudo realizado por Santos (2009), que analisou cromatogramas de extratos de plantas, identificou a presença de um pico referente ao ácido chiquímico no intervalo de 0 a 3 minutos, a 236nm. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os achados de Santos (2009), reforçando a hipótese de que o pico observado corresponde ao ácido chiquímico.

Posteriormente, a aquisição de um padrão analítico grau HPLC permitiu a realização de novos testes para confirmação dessa hipótese, cujos resultados podem ser observados na figura 13.

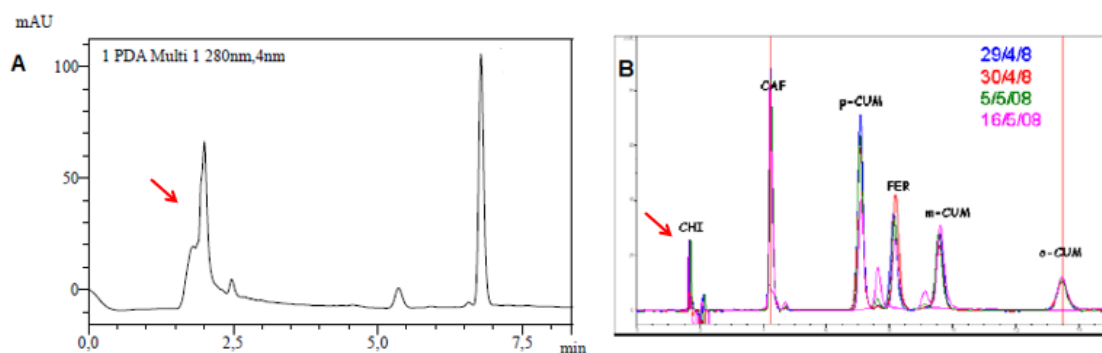
Figura 13. Cromatograma obtido por HPLC para o padrão de ácido chiquímico.



5.6 ÁCIDO CHIQUÍMICO

Com base no perfil cromatográfico, é possível observar a presença de um pico nos cromatogramas que não estava relacionado à bioconversão do ácido ferúlico aos compostos estudados, como vanilina, 4-vinilguaiaicol, ácido vanílico, mas que coincidiu com o tempo de retenção do ácido chiquímico (SANTOS, 2009). Essa descoberta ampliou o escopo da pesquisa, revelando a presença de um composto em alta concentração e com um perfil cromatográfico aceitável, além de desempenhar um papel significativo nas interações bioquímicas e nos processos metabólicos associados aos compostos fenólicos. Na figura 14 temos em; A- o perfil cromatográfico obtido nas análises do teste de tolerância e em B- o perfil cromatográfico obtido através da literatura (SANTOS, 2009).

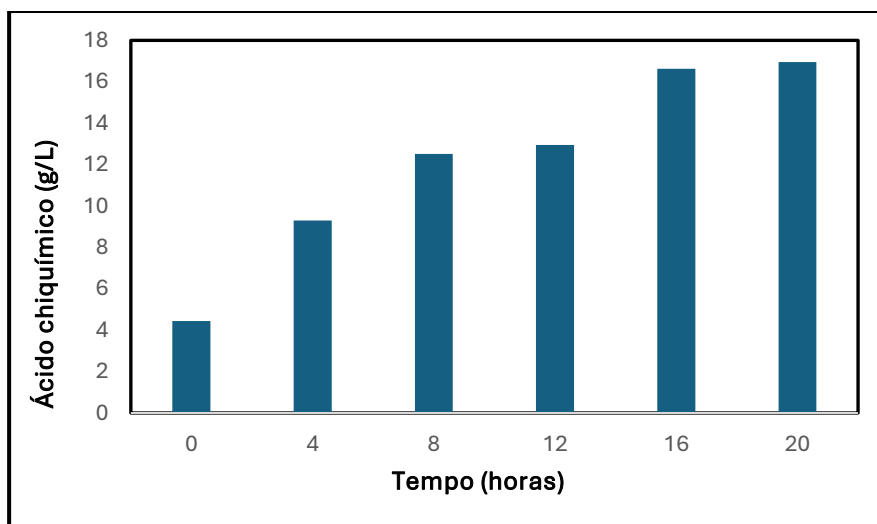
Figura 14. Perfil cromatográfico obtido por HPLC do ácido chiquímico. A- Cromatograma do teste de tolerância. B- Cromatograma padrão da literatura.



Fonte: Adaptado de Santos, 2009.

Após a análise dos resultados experimentais em comparação com trabalhos de autores como de Santos, (2009), foi possível concluir que o isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum Essa produção foi quantificada com precisão através de análises dos metabólitos por HPLC utilizando um padrão puro de ácido chiquímico como referência. Os dados sugerem que o metabolismo bacteriano possui uma rota de produção de ácido chiquímico, independentemente da presença de ácido ferúlico no meio de cultivo assim como mostra a figura 15.

Figura 15. Quantificação do ácido chiquímico por HPLC ao longo das 20 horas de fermentação.

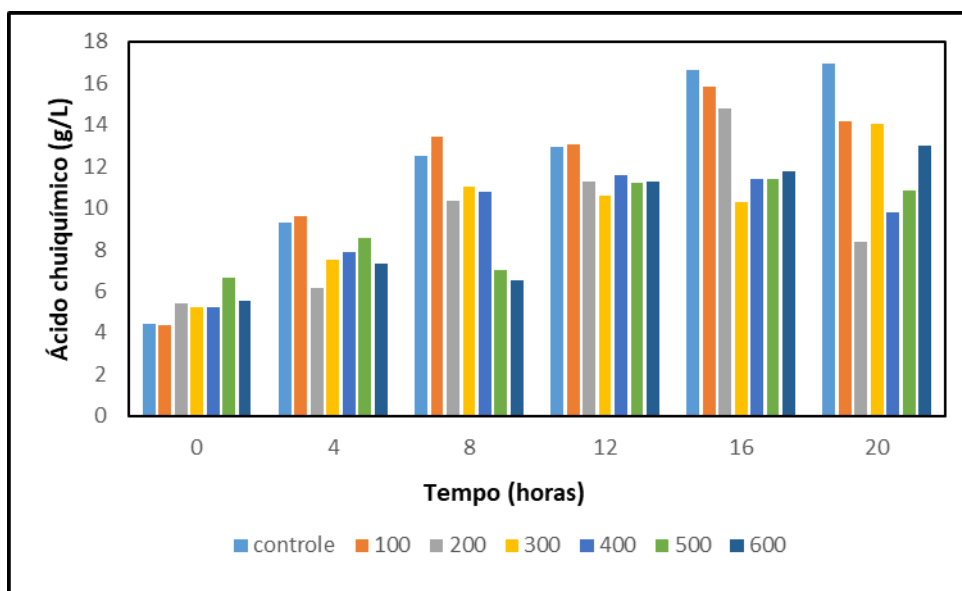


A quantificação do ácido chiquímico por HPLC revelou que sua produção aumenta progressivamente ao longo das 20 horas de fermentação, mesmo na presença de ácido ferúlico. Isso indica que a degradação do ácido ferúlico não está relacionada à ativação da via metabólica para a produção do ácido chiquímico. Os valores de ácido chiquímico aumentam exponencialmente, atingindo aproximadamente 16 g/L ao final de 20 horas de fermentação.

Em comparação com outros trabalhos da literatura que visaram a produção de ácido chiquímico observa-se que o presente estudo corrobora com os resultados obtidos por diferentes isolados bacterianos. Por exemplo, Rawat e colaboradores (2013) utilizaram um isolado de *Citrobacter* sp e alcançaram uma produção de 0,54 g/L de ácido chiquímico. Já Tripathi e colaboradores (2015), utilizando o isolado de *Citrobacter freundii*, obtiveram uma produção de 20,12 g/L de ácido chiquímico. Esses trabalhos corroboram os achados do presente estudo, que utiliza um isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum para a produção de ácido chiquímico, reforçando o potencial biotecnológico de bactérias na síntese dessa molécula. Além disso, os resultados também corroboram com os dados da análise de expressão proteica, que evidenciam um perfil de expressão possivelmente relacionado às enzimas envolvidas na via metabólica de síntese do ácido chiquímico para o meio Horikoshi, nos tempos de 4 e 8 horas.

A constatação de que o isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum mantém sua capacidade de biossíntese do ácido chiquímico mesmo na presença de ácido ferúlico sugere que o caminho metabólico envolvido não é induzido ou reprimido pelo ácido ferúlico (Figura 16). Além disso, a capacidade do isolado *Paenibacillus* sp. JAB-Hum de produzir ácido chiquímico em concentrações significativas destaca seu potencial para aplicações industriais, especialmente em contextos em que a produção sustentável e de alto rendimento é essencial (SANTOS 2009).

Figura 16. Quantificação de ácido chiquímico em meio suplementado com ácido ferúlico por HPLC ao longo das 20 horas de fermentação.



Testes realizados na presença de ácido ferúlico em diferentes concentrações (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg/L) mostraram que, embora o ácido chiquímico seja produzido na presença do ácido ferúlico, este último mostra-se como um agente tóxico para o isolado de *Paenibacillus*

sp. JAB-Hum, afetando o crescimento celular, conforme evidenciado pelos resultados da curva de crescimento (Figura 8).

Além disso, os resultados indicaram que, na concentração de 100 mg/L, o ácido ferúlico não influencia negativamente a produção de ácido chiquímico. Nessa concentração, os valores obtidos para a produção de ácido chiquímico foram de 14 g/L, representando o valor máximo alcançado em comparação com as demais concentrações. Ademais, ao longo da fermentação na presença de 100 mg/L, a produção de ácido chiquímico foi praticamente equivalente à observada no controle.

Para as concentrações de 200, 300 e 400 mg/L de ácido ferúlico no meio de cultivo, a produção de ácido chiquímico manteve-se estável entre 8 e 16 horas de cultivo, com uma média de 10 g/L. Já para as concentrações de 500 e 600 mg/L, a produção começou a aumentar após 12 horas de cultivo, mantendo-se elevada até o final da fermentação, também com uma média de 10 g/L, semelhante às concentrações menores. Embora a concentração de 100 mg/L seja a mais eficiente para a produção de ácido chiquímico e crescimento do isolado, as demais concentrações também resultaram na produção do composto, ainda que em menores quantidades.

Esses resultados sugerem que a concentração inicial de ácido ferúlico influencia o tempo necessário para a produção de ácido chiquímico, podendo retardar o início do processo. Além disso, concentrações mais elevadas possivelmente exercem um efeito inibitório sobre o metabolismo do isolado estudado, impactando a eficiência da síntese do composto.

Estudos da literatura que investigaram a produção de ácido chiquímico em diferentes meios de produção e com outros isolados bacterianos apresentam resultados que corroboram os achados deste trabalho. Ghosh e colaboradores (2016) utilizaram um isolado modificado de *Bacillus megaterium* e obtiveram uma produção de 6 g/L em fermentações utilizando meio LB com modificações. Já Knop e colaboradores (2001), empregaram um isolado de *Escherichia coli* em fermentações de 48 horas, alcançaram uma produção de 28 g/L de ácido chiquímico.

Esses estudos corroboram com os resultados deste trabalho, que demonstram que o isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum é capaz de produzir aproximadamente 14 g/L de ácido chiquímico, mesmo na presença de 100 mg/L de ácido ferúlico.

5.7 AVALIAÇÃO DE NUTRIENTES

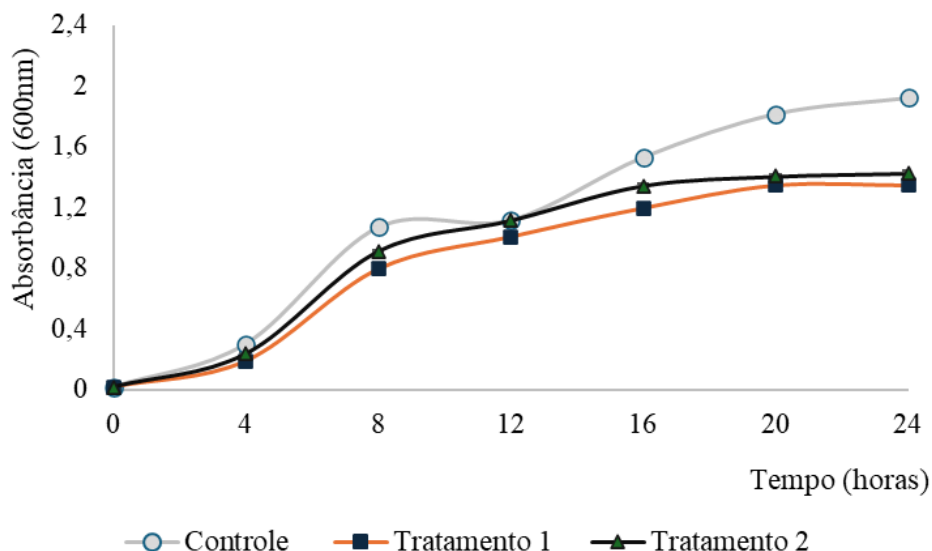
Com base nos resultados obtidos anteriormente e com o objetivo de investigar a relação entre a composição do meio de cultivo e as fontes de nutrientes para a produção de ácido chiquímico. Para aprofundar essa análise, foram realizados ensaios com diferentes fontes de nutrientes, visando avaliar se os aminoácidos presentes no meio Horikoshi influenciavam a produção de ácido chiquímico e a ativação das vias metabólicas envolvidas.

A peptona e o extrato de levedura são componentes comuns em meios de cultivo que fornecem uma variedade de aminoácidos e nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano. A peptona é uma fonte de aminoácidos e peptídeos de baixa massa molecular obtidos por hidrólise enzimática de proteínas, enquanto o extrato de levedura contém uma ampla gama de compostos bioativos, incluindo aminoácidos e vitaminas, que podem influenciar o metabolismo bacteriano (CRUZ et al., 2001).

Os testes foram conduzidos para verificar qual dessas fontes contribui de forma significativa para a produção de ácido chiquímico. Foram realizados experimentos comparativos onde os meios foram ajustados para conter apenas um dos componentes (peptona ou extrato de levedura) enquanto o outro componente não era utilizado. A produção de ácido chiquímico foi então monitorada ao longo do tempo de fermentação e posteriormente quantificada para cada condição.

Foram realizadas análises do crescimento bacteriano ao longo do processo de fermentação, conforme mostrado na Figura 17. Essa análise permitiu avaliar o crescimento da bactéria ao longo do cultivo, fornecendo informações sobre a dinâmica de crescimento e a eficiência da fermentação, os resultados obtidos mostram que a ausência de um dos componentes do meio afeta diretamente as velocidades do crescimento celular.

Figura 17. Perfil de crescimento bacteriano ao longo do tempo de fermentação, por análises de absorvância. Controle – meio Horikoshi completo; Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.



A Figura 17 demonstra que, o tratamento 1 em meio com ausência de peptona, mas contendo extrato de levedura, o crescimento do isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum é significativamente menor em comparação aos outros meios testados. Isso indica que a cepa

necessita de uma fonte de aminoácidos e peptídeos para seu crescimento adequado (CRUZ et al., 2001). Por outro lado, no tratamento 2 em meio contendo peptona e sem extrato de levedura, o crescimento do isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum não é tão afetado.

Após o período de cultivo, foram realizadas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o objetivo de determinar qual substrato levou à maior produção de ácido chiquímico. Através dessa técnica, foi possível quantificar de forma precisa a concentração do ácido chiquímico produzido, permitindo a comparação entre os diferentes substratos testados. Os resultados, apresentados na Figura 18 fornecem uma visão detalhada sobre a eficiência de cada substrato na produção de ácido chiquímico, auxiliando na escolha do meio de cultivo mais adequado para otimizar a produção desse composto. No entanto, como mostrado na Tabela 7, a produção de ácido chiquímico é impactada negativamente, sugerindo que a ausência de vitaminas e aminoácido pode influenciar a síntese desse composto (CRUZ et al., 2001).

Figura 18. Quantificação do ácido chiquímico foi realizada considerando o tempo de cultivo e a quantidade produzida em cada meio avaliado. Os tratamentos analisados incluíram o: Controle – meio Horikoshi completo; Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.

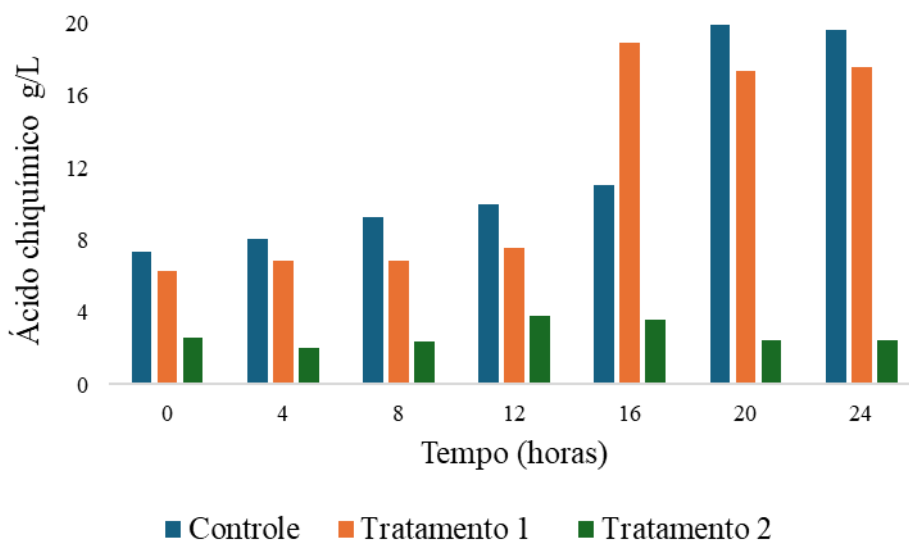


Tabela 7. Quantificação do ácido chiquímico produzidos ao longo de 24 horas de fermentação. Controle – meio Horikoshi completo; Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.

Tempo (horas)	Controle	Tratamento 1	Tratamento 2
0	7,33	6,315	2,615
4	8,04	6,88	2
8	9,26	6,88	2,35
12	9,96	7,549	3,79
16	11,02	18,887	3,56
20	19,92	17,341	2,44
24	19,645	17,541	2,44

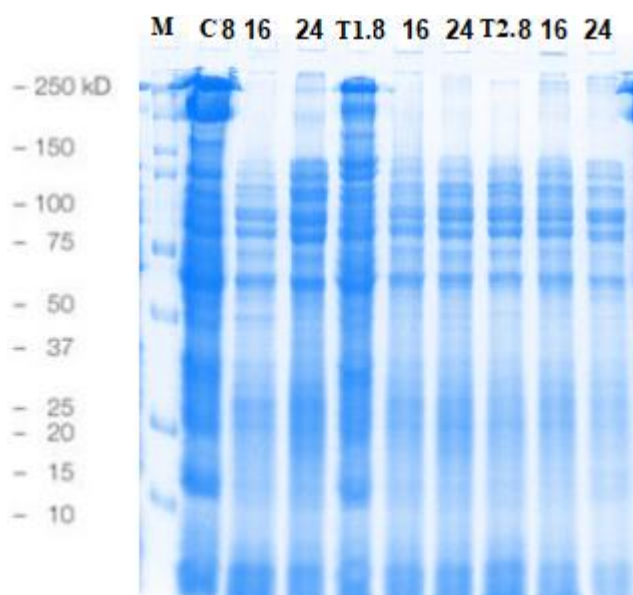
A Figura 18 e a Tabela 6 evidenciam que, para o tratamento 1 em meio com ausência de peptona, mas contendo extrato de levedura, a produção de ácido chiquímico é praticamente igual à observada no controle com o meio Horikoshi, alcançando aproximadamente 17 g/L com 20 e 24 horas de fermentação. Por outro lado, no tratamento 2 em meio contendo peptona e sem extrato de levedura, a produção de ácido chiquímico permanece baixa durante todo o processo fermentativo. Esses resultados sugerem que a ausência de vitaminas, aminoácidos e sais minerais, presentes no extrato de levedura, influenciam negativamente a produção de ácido chiquímico (CRUZ et al., 2001). Vale ressaltar que esses resultados estão em concordância com os obtidos no teste de tolerância (Figura 15).

Segundo Krell e colaboradores (1998) a deficiência de cátions como magnésio, ferro e cálcio podem reprimir a via metabólica do corismato, inativando a enzima chiquimato quinase. Essa enzima é indispensável para a continuidade da rota metabólica até a síntese de corismato. O que leva ao acúmulo do ácido chiquímico no meio de cultivo. Além disso, a ausência de glicose no meio, descrita na literatura como uma importante fonte de substrato para a produção de ácido chiquímico, pode comprometer a regulação da via metabólica. Sem a glicose, a rota metabólica pode permanecer incompleta, não regulando adequadamente as enzimas necessárias para avançar até o corismato (GHOSH et al., 2012).

Para avaliar o perfil de expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo durante a fermentação em diferentes meios de cultivo, foi realizada eletroforese SDS-PAGE utilizando as células sonicadas em distintos tempos de cultivo. A análise do perfil proteico da célula, obtida após a lise da membrana, revelou a presença de proteínas com variadas massas moleculares. Esses resultados sugerem que o isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum apresenta perfis diferenciados de expressão de proteínas conforme o meio de cultivo utilizado, conforme ilustrado na Figura 19. Dentre as possíveis enzimas envolvidas nesse processo, destacam-se a desidroquinato sintase, a 3-desidroquinato desidratase, a chiquimato-5-desidrogenase e a chiquimato quinase, enzimas

essenciais na via metabólica que leva à produção de ácido chiquímico dentro da rota metabólica do chiquimato.

Figura 19. Gel de acrilamida 10% SDS – PAGE, contendo amostras provenientes da célula sonicada do cultivo. Canaletas: M– marcador de massa molecular (“Precision Plus Protein Dual Color Standards” – BioRad); C. Controle – meio Horikoshi completo; T1. Tratamento 1 – meio Horikoshi sem a presença de peptona; T2. Tratamento 2- meio Horikoshi sem a presença de extrato de levedura.



A figura 19 mostra que, no controle com meio Horikoshi, o perfil de expressão de proteínas no tempo de 8 horas é diferente em comparação com os tempos de 16 e 24 horas, apresentando alterações significativas nos perfis. Essa variação também foi observada no tratamento 1 meio suplementado com extrato de levedura e com ausência de peptona, onde o perfil de 8 horas se distingue dos perfis obtidos nos tempos de 16 e 24 horas. No entanto, essa característica não foi identificada no tratamento 2 meio suplementado com peptona e na ausência de extrato de levedura, onde os perfis se mantiveram consistentes ao longo dos tempos analisados.

Ao comparar os resultados dos testes de HPLC e de eletroforese, observa-se que, para o controle meio Horikoshi e para o tratamento 1 com presença extrato de levedura e ausência de peptona, a produção de ácido chiquímico aumenta progressivamente ao longo das 24 horas de fermentação. Em contraste, com o tratamento 2 meio suplementado com peptona e ausência de extrato de levedura, onde a produção de ácido chiquímico permanece baixa durante todo o processo fermentativo. Essas diferenças sugerem que a expressão proteica pode estar diretamente relacionada à produção de ácido chiquímico, possivelmente por meio da ativação de enzimas envolvidas na rota metabólica dessa molécula ou da inibição de determinadas enzimas, resultando

em seu acúmulo em vez de sua conversão em outros metabólitos envolvidos na rota metabólica (MIR et al., 2013).

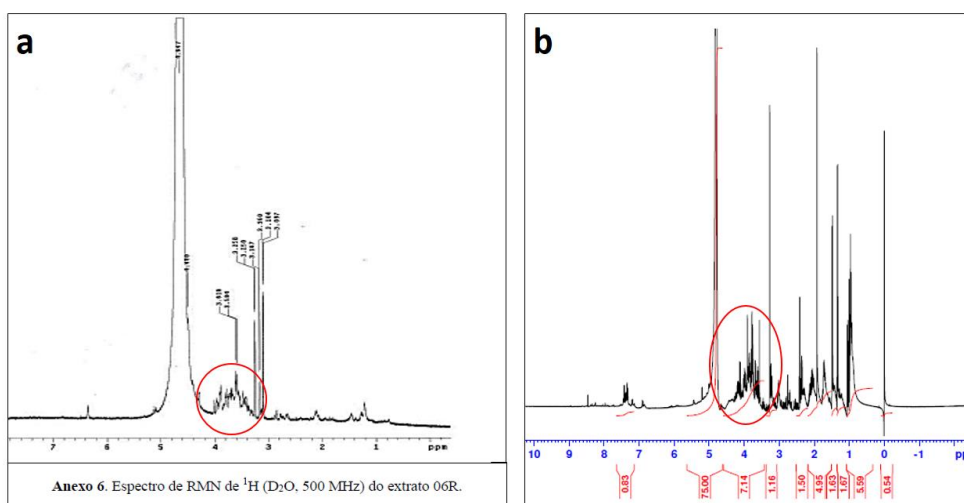
Como os ensaios de perfil de expressão de proteínas não incluíram controles específicos para identificar a enzima relacionada à produção do ácido chiquímico, foi adotada uma estratégia alternativa para confirmar a presença desse composto no extrato bruto. Essa estratégia consistiu na realização de análises de RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Os resultados obtidos a partir dessas análises são discutidos a seguir.

5.8 RMN - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizada para se determinar a estrutura da molécula do ácido chiquímico que foi obtida nos ensaios por HPLC. Essa análise foi realizada por meio de um estudo detalhado dos espectros de carbono (^{13}C) e hidrogênio (^1H).

Cardoso (2013) caracterizou o ácido chiquímico em extratos de *Eichhornia crassipes* (aguapé) por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), identificando sinais característicos entre 4 e 3 ppm. No presente estudo, observamos sinais semelhantes na região de 4-3 ppm nos espectros de RMN ^1H do extrato fermentativo de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum, o que corrobora a presença de ácido chiquímico nessa amostra, em concordância com os resultados de Cardoso (2013). No entanto, é importante destacar que, enquanto a amostra analisada por Cardoso (2013) passou por um processo de purificação, no presente estudo a amostra não foi purificada, o que pode justificar a presença de outros sinais no espectro. Ainda assim, foram detectados sinais adicionais característicos para o ácido chiquímico no extrato de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum, como mostrado na Figura 20b.

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (DSO, 300 MHz) de AC de *Eichhornia crassipes* (a) e de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum (b).



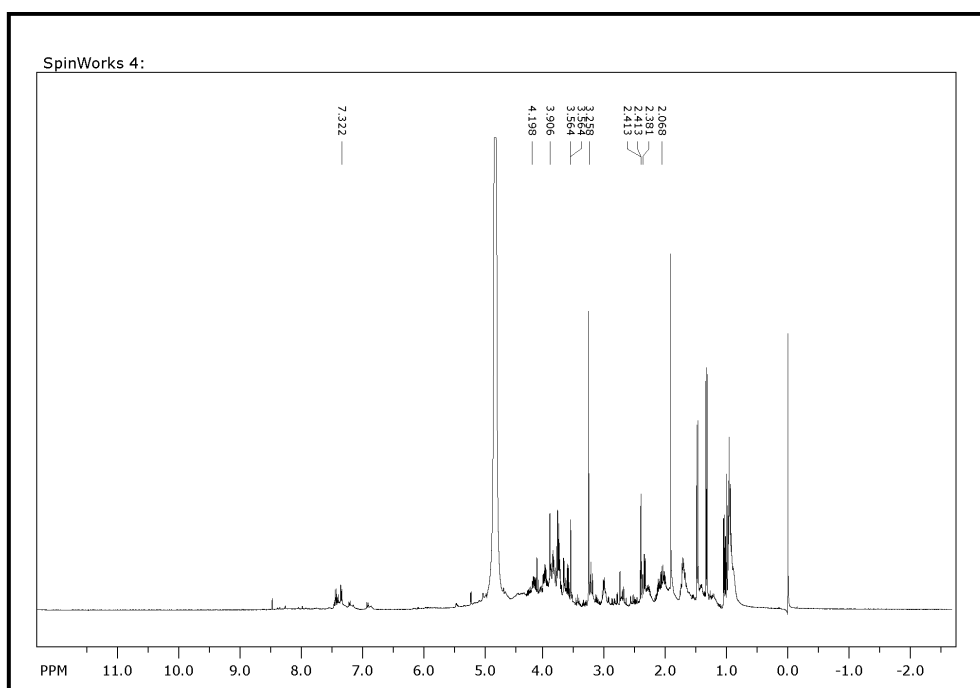
A fim de identificar de forma precisa todos os prótons de hidrogênio presentes na amostra, foram utilizados como referência os dados espectrais de um padrão de ácido chiquímico puro (SpectralCode HSP-46-103), obtidos do banco de dados SDBS - Spectral Database for Organic Compounds. Os deslocamentos químicos desse padrão foram tabulados (Tabela 8) e serviram como base para a análise dos dados brutos da amostra fermentada de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum. A partir dos dados brutos, foi feito um novo espectro, destacando apenas as regiões características dos prótons do ácido chiquímico (Figura 21), com seus respectivos deslocamentos químicos. A análise dos dados foi realizada utilizando o software SpinWorks 4.

Tabela 8. Deslocamento químico (valores em ppm) do próton de H da amostra fermentada de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum. e de uma amostra referência pura de ácido chiquímico.

Posição (C)	AC (400 MHz) Tese,2024	AC SpectralCode HSP-46-103
2	7,32	6,58
3	4,19	4,21
4	3,56	3,56
5	3,90	3,86
6a	2,41	2,42
6b	2,06	2,13

A comparação dos espectros de RMN ^1H do extrato fermentativo de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum com o espectro de um padrão de ácido chiquímico (SpectralCode HSP-46-103) revelou valores de deslocamentos químicos muito parecidos para os sinais dos prótons. Essa concordância indica a presença do ácido chiquímico na amostra fermentada. A Figura 21 apresenta o espectro de RMN ^1H , evidenciando as regiões características dos prótons aromáticos (7-8 ppm) e alifáticos (0-4 ppm) do ácido chiquímico. A multiplicidade e os deslocamentos químicos dos sinais na região aromática confirmam a presença de um anel aromático, enquanto os sinais na região alifática são consistentes com a presença de prótons ligados a carbonos sp^3 . Esses resultados corroboram a identificação do ácido chiquímico no extrato fermentativo.

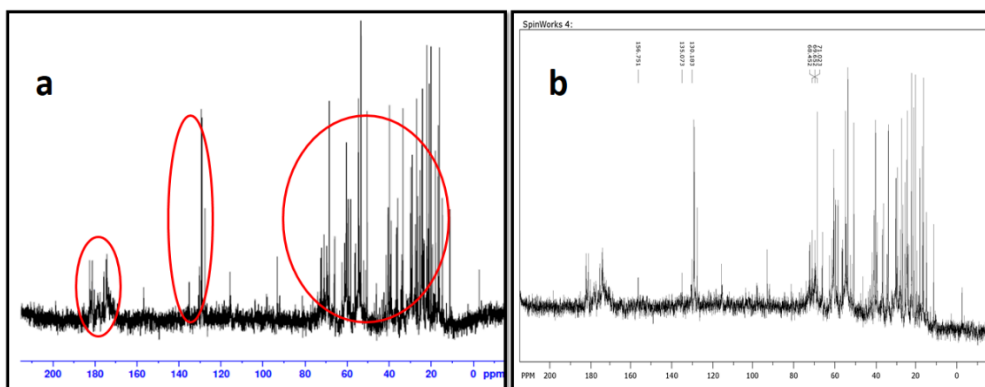
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (DSO, 400 MHz) de AC isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum.



Além das análises de RMN ^1H também foram realizadas as análises de RMN ^{13}C para a caracterização dos átomos de carbono (Figura 22a e 22b). A partir dos dados brutos, foi feito um novo espectro (Spinworks), destacando apenas as regiões características dos prótons do Carbono (Figura 22b), com seus respectivos deslocamentos químicos. A análise dos espectros permitiu a identificação dos diferentes tipos de carbonos presentes na molécula (Figura 23a e 23b), como carbonos aromáticos, carbonilas e metilênicos, através da comparação dos deslocamentos químicos experimentais com valores tabelados (Tabela 9) e com o espectro de um padrão autêntico obtido da literatura (Figura 23a) e do SDBS – Spectral Database for Organic Compounds (Figura 23b). A análise dos acoplamentos spin-spin permitiu confirmar a conectividade entre os átomos de carbono e, consequentemente, elucidar a estrutura completa do ácido chiquímico.

Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C (DSO, 400 MHz) de AC isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-

Hum **a** – Espectro da amostra de ácido chiquímico mostrando a localização dos prótons de carbono. **b** – Espectro da amostra de ácido chiquímico mostrando o deslocamento químico após análise detalhada dos picos através do software Spinworks4.



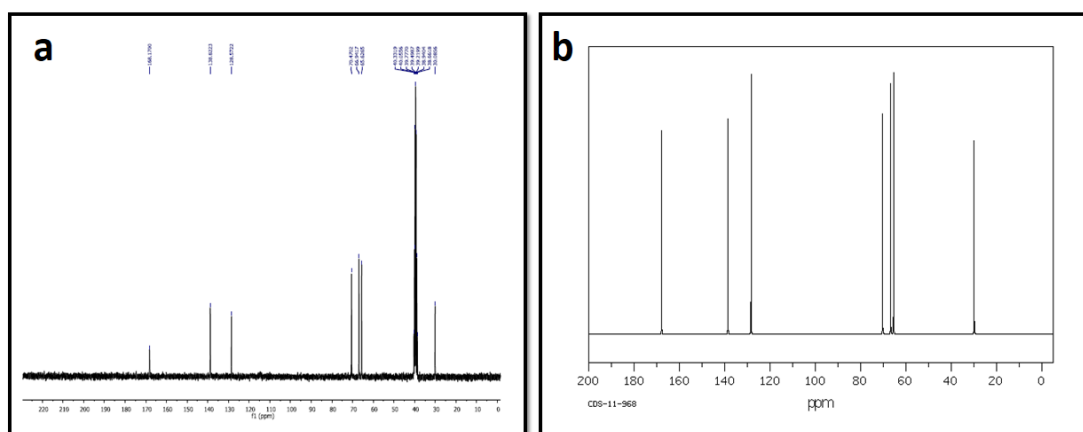
O ácido chiquímico possui uma estrutura cíclica baseada em um ciclohexeno, com três grupos hidroxila (-OH) e um grupo carboxila (-COOH) como substituintes. Especificamente, o carbono 1 (C1) do ciclohexeno está diretamente ligado ao oxigênio carbonílico do grupo carboxila, formando um grupo funcional carbonila. Além disso, o carbono 2 (C2) forma uma ligação dupla com o carbono 3 (C3), caracterizando a presença de um anel aromático. A região entre 160 e 200 ppm, característica de carbonilas, confirma a presença do grupo carboxila. A região entre 100 e 160 ppm, típica de carbonos sp^2 , indica a existência de ligações duplas e do anel aromático. Por fim, a região entre 0 e 60 ppm é atribuída a carbonos saturados (hibridização sp^3).

Os resultados apresentados corroboram com os dados de RMN de ^{13}C do ácido chiquímico puro disponíveis na base de dados SDBS e com os estudos prévios de Cardoso (2013), evidenciando estruturalmente o ácido chiquímico.

Tabela 9. Deslocamento químico (valores em ppm) do núcleo de carbono obtido através da análise de RMN ^{13}C da amostra fermentada de *Paenibacillus* sp. e deslocamento do núcleo de carbono de uma amostra referência pura de ácido chiquímico

Posição (C)	AC (400 MHz) de <i>Paenibacillus</i> sp.	AC padrão puro SpectralCode CDS-11-968
1	156,70	167,87
2	135,07	138,59
3	130,26	128,34
4	68,45	70,32
5	69,65	66,74
6	71,82	65,42
7	29,65	29,89

Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (DSO) de amostras puras de AC, **a** (Cardoso, 2013) e **b** (SDBS - Spectral code:CDS-11-968).



A análise dos acoplamentos spin-spin revelou um sinal em 4,19 ppm, atribuído ao hidrogênio em C3, na forma de um dubleto com constante de acoplamento vicinal de 2,8 Hz, indicando uma interação com o hidrogênio em C2. O valor relativamente baixo da constante de acoplamento sugere uma geometria antiperiplanar entre esses hidrogênios, corroborando com os dados de Cardoso (2013) e Bockkov *et al.* (2012). Os hidrogênios ligados ao anel aromático do ácido chiquímico exibem uma variedade de multiplicidades, incluindo singletos, dubletos e multipletos complexos, devido aos diversos acoplamentos possíveis. O sinal em 3,61 ppm, atribuído ao hidrogênio em C4, apresenta-se como um multipeto complexo, resultado de acoplamentos com múltiplos hidrogênios vizinhos. Os sinais em 2,41 e 2,08 ppm, atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos em C6, apresentam multiplicidades distintas: um dubleto e um duplo

dubleto, respectivamente. Os valores das constantes de acoplamento obtidos para esses hidrogênios estão em concordância com os dados reportados na literatura, conforme apresentado na Tabela 10 (Cardoso, 2013; Bochkov et al., 2012).

Vale a pena destacar também que o uso de água deuterada como solvente pode ter influenciado o deslocamento químico de hidrogênios envolvidos em trocas rápidas com prótons do solvente, como hidrogênios de grupos hidroxila. No caso do ácido chiquímico, a presença de água deuterada pode levar ao alargamento ou desaparecimento de sinais correspondentes a esses hidrogênios, simplificando o espectro.

Tabela 10. Deslocamento químico (valores em ppm) e multiplicidade dos sinais do núcleo de hidrogênio obtido através da análise de RMN ^1H da amostra fermentada de *Paenibacillus* sp.

Posição (C)	AC (400 MHz) Tese, 2024	AC (500 MHz) Cardoso, 2013.	Ácido Chiquímico (300 MHz) Bochkov et al., 2012.
2	7,32 sl	6,68 sl	6,70 m
3	4,19 dl (2,8)	4,32 sl	4,30 m
4	3,61 m	3,64 m	3,67 dd (8,4 e 4,5)
5	3,90 m	3,90 dl (6,5)	3,93 m
6a	2,41 dl (4,8)	2,61 dd (18,1 e 4,5)	2,64 dd (18,0 e 4,8)
6b	2,08 dd (18,1 e 8)	2,09 dd (18,1 e 6,5)	2,12 dd (18,0 e 6,3)

Em resumo, o gênero *Paenibacillus* sp. se destaca como um potencial produtor de ácido chiquímico, seja por acúmulo devido à regulação da rota metabólica ou por outros mecanismos ainda não totalmente compreendidos. Esse potencial abre novas possibilidades para o uso de *Paenibacillus* em aplicações biotecnológicas, especialmente na produção de compostos fenólicos de interesse industrial e farmacêutico. O aprofundamento dos estudos sobre sua capacidade de produção e as condições que favorecem a síntese do ácido chiquímico podem levar a descobertas significativas, ampliando as perspectivas para a otimização de processos biotecnológicos e a exploração desse microrganismo em diversas áreas.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o isolado de *Paenibacillus* sp. possui um notável potencial para a produção de ácido chiquímico, possivelmente devido à presença de genes que codificam as enzimas essenciais da via metabólica responsável por sua síntese. A produção dessa molécula, no entanto, mostrou-se sensível às condições do meio de cultivo, destacando a importância da composição do mesmo para a otimização do processo fermentativo. Os resultados revelaram que o meio contendo extrato de levedura foi mais eficiente para a produção de ácido chiquímico, alcançando níveis semelhantes ao meio Horikoshi, utilizado como controle. Isso sugere que a presença de vitaminas e aminoácidos no extrato de levedura desempenha um papel crítico na ativação das enzimas da via metabólica. Em contraste, o meio contendo peptona resultou em baixa produção, reforçando que a ausência desses nutrientes pode limitar a síntese.

Outro fator determinante identificado foi a disponibilidade de cátions como magnésio, ferro e cálcio, que atuam como cofatores para enzimas chave, como a chiquimato quinase. A deficiência desses cátions pode inativar essa enzima, interrompendo a rota metabólica e resultando no acúmulo de ácido chiquímico no meio de cultivo. Além disso, a ausência de glicose no meio, já descrita na literatura como um importante substrato, pode reprimir a expressão de genes e enzimas essenciais, impedindo a conversão do ácido chiquímico em corismato.

Os perfis de expressão proteica analisados indicam que as enzimas envolvidas na síntese de ácido chiquímico são reguladas de maneira distinta dependendo do meio de cultivo e da presença de precursores específicos. Essa regulação reforça a ideia de que a produção dessa molécula pode ser aprimorada com ajustes nas condições de fermentação.

Ainda, foi observado que o ácido ferúlico, em concentrações elevadas, atua como um agente tóxico para o isolado de *Paenibacillus* sp., afetando o crescimento celular. Contudo, na concentração de 100 mg/L, sua presença não impactou significativamente a produção de ácido chiquímico, sugerindo um limite crítico de tolerância do isolado a esse composto.

Por fim, ao comparar os resultados obtidos com estudos da literatura, como os trabalhos de *Bacillus megaterium* e *Escherichia coli*, foi evidente que o isolado de *Paenibacillus* sp. apresenta um desempenho competitivo, produzindo valores máximos de 18 g/L de ácido chiquímico. Esse resultado reforça o potencial biotecnológico dessa bactéria para aplicações industriais, especialmente em processos que visam a produção sustentável de compostos de interesse.

Esses achados abrem caminhos para futuras otimizações, como o ajuste do meio de cultivo com adição de cofatores, precursores e substratos adequados, visando maximizar a eficiência da produção e explorar ao máximo o potencial do isolado *Paenibacillus* sp. JAB-Hum.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ARCURI, Helen Andrade. Bioinformática estrutural aplicada ao estudo de enzimas da via metabólica do ácido chiquímico. 2008. 113 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2008. <http://hdl.handle.net/11449/100467>
- ALVES, K. C.S., ALMEIDA, M.E.M., GLÓRIA, J.C., SANTOS, F.A., PEREIRA, K.D., CASTRO, D.P., MARIÚBA, A.M. Bacillus subtilis: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 2, p. 15-23, ISSN:2238.1910. 2018. <http://www.scientia-amazonia.org>
- BARCELLOS, Guy Barros; CACERES, Rafael Andrade; DE AZEVEDO, Walter Filgueira. Structural studies of shikimate dehydrogenase from Bacillus anthracis complexed with cofactor NADP. **Journal of molecular modeling**, v. 15, p. 147-155, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0403-z>
- BATORY, M; ROTSZTEJN, H. Shikimic acid in the light of current knowledge. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 21, n. 2, p. 501-505, 2022. <https://doi.org/10.1111/jocd.14136>
- BENTO-SILVA, Andreia et al. Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability? **European journal of nutrition**, v. 59, p. 1275-1293, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01987-6>
- BERNARDO, M.S.C., SCARPASSA, J. A.; MONTEIRO, D. A.; LADINO-ORJUELA, G.; SILVA, R. Da; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7. **Braz J Microbiol** 52, 1181–1190. 2021. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00462-x>
- BERNAL, P.; MOLINA-SANTIAGO, C.; DADDAOUA, A.; LIAMAS, M.A. Antibiotic adjuvants: identification and clinical use. **Microbia IBiotechnology**, 6, 445–449. 2013. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12044>
- BERTANI, Giuseppe. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293-300, 1951. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>

- BOZ, H. p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 11, p. 2323-2328, 2015. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12898>
- CARPENTER, Elisabeth P. HAWKINS, A.R., FROST, J.W., BROWN, K.A. Structure of dehydroquinase synthase reveals an active site capable of multistep catalysis. **Nature**, v. 394, n. 6690, p. 299-302, 1998. <https://doi.org/10.1038/28431>
- CARVALHO, Carina Miranda. Biossíntese de nanopartículas de ouro por *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terra*. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, 2020. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/13430>
- CRUZ, S. H. da., CASSIO, F., L, C., & ERNANDES, J. R. O efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no transporte de amônio em *Saccharomyces cerevisiae*. **Eclética Química**, 26, 157–173. 2001 <https://doi.org/10.1590/S0100-46702001000100012>
- CHESSON, Andrew; STEWART, Colin S.; WALLACE, R. John. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 597-603, 1982. <https://doi.org/10.1128/aem.44.3.597-603.1982>
- CHIEN, Chih-Ching; HAN, Chu-Ting. Tellurite Resistance and Reduction by a *Paenibacillus* sp. Isolated from Heavy Metal-Contaminated Sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 28, n. 8, p. 1627-1632, 2009. <https://doi.org/10.1897/08-521.1>
- CIVOLANI, Claudio et al. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2311-2317, 2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2311-2317.2000>
- COGGINS, J. R. ABELL, C., EVANS, L.B., FREDERICKSON, M., ROBINSON, D.A., ROSZAK, A.W., LAPHORN, A.P. Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 3, p. 548-552, 2003. <https://doi.org/10.1042/bst0310548>
- CONSTANCIO, M.T.L., SACCO, L.P., CAMPANHARO, J.C. C., CASTELLANE, T. C.L., SOUZA, A.C.O., WEISS, B. VARANI, A.M., ALVES, L.M.C. Exploring the Potential of Two Bacterial Consortia to Degrade Cellulosic Biomass for Biotechnological Applications. **Curr Microbiol** 77, 3114–3124. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02136-7>
- CORCOLL, N., OSTERLUND, T., SINCLAIR, L., EILER, A., KRISTIANSSON, E., BCKHAUS, T., ERIKSSON, M. Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 14, p. fnx139, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx139>

DJORDJEVIC SP, FORBES WA, SMITH LA, HORNITZKY MA. Genetic and Biochemical Diversity among Isolates of *Paenibacillus alvei* Cultured from Australian Honeybee (*Apis mellifera*) Colonies. **Appl Environ Microbiol**. 66. 2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1098-1106.2000>

SANTOS, M.D.R. **Desenvolvimento de método cromatográfico (HPLC-UV) para a determinação de ácidos fenólicos extraídos por ultra-som de forrageiras tropicais**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Juiz de Fora. <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/4423>

SANTOS-SÁNCHEZ, F.N., SALAS-CORONADO, R., HERNÁNDEZ-CARLOS, B., & VILLANUEVA-CAÑONGO, C. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**. 2019. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.83815>

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>

DÍAZ-QUIROZ, D. C.; CARDONA-FÉLIX, C. S.; VIVEROS-CEBALLOS, J. L.; REYES-GONZÁLEZ, M. A.; BOLÍVAR, F.; ORDOÑEZ, M.; ESCALANTE, A Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 33, n. 1, p. 397-404, 2018. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1422125>

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

FORSGREN, E; STEVANOVIC, J; FRIES, I. Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus* larvae genotypes. **Veterinary microbiology**, v. 129, n. 3-4, p. 342-349, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.001>

GHOSH, S; CHISTI, Y; BANERJEE, U.C. Production of shikimic acid. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1425-1431, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.001>

GHOSH, S; MOHAN, U; BANERJEE, U.C. Studies on the production of shikimic acid using the *aroK* knockout strain of *Bacillus megaterium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2092-6>

GHOSH, S.; PAWAR, H.; PAI, O.; BANERJEE, U. C. Microbial transformation of quinic acid to shikimic acid by *Bacillus megaterium*. **Bioresources and Bioprocessing**. 1,7 n. 1, p. 1-6, 2014. <https://doi.org/10.1186/s40643-014-0007-7>

GIACON, T. G.; DE GOIS E CUNHA, G. C.; ELIODÓRIO, K. P.; OLIVEIRA, R. P. de S.; BASSO, T. O. Homo- and heterofermentative lactobacilli are distinctly affected by furanic compounds. **Biotechnology Letters**, v. 44, n. 12, p. 1431-1445, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10529-022-03310-6>

Guerra, A.F. *Microbiologia de Alimentos: Métodos de Contagem Microbiana*; Editora **Valença**: Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 2016; p. 28
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Microbiologia+de+Alimentos:+M%C3%A9todos+de+Contagem+Microbiana&author=Guerra,+A.F.&publication_year=2016

GUERRA, M. E. S.; DESTRO, G.; VIEIRA, B.; LIMA, A. S.; FERRAZ, L. F. C.; HAKANSSON, A. P.; DARRIEUX, M.; CONVERSO, T. R. *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 877995, 2022. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 473-503, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>

KAULPIBOON, J; PONGSAWASDI, P. Purification and characterization of cyclodextrinase from *Paenibacillus* sp. A11. **Enzyme and microbial technology**, v. 36, n. 2-3, p. 168-175, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.028>

KARYOLAIMOS, A.; AMPAH-KORSHA, H.; HILENAAR, T.; BORRAS, A.M.; DOLATA, K.M.; SIEVERS, S.; RIEDEL, K.; DANIELS, R.; GIER, J.W. Enhancing Recombinant Protein Yields in the *E. coli* Periplasm by Combining Signal Peptide and Production Rate Screening. **Front. Microbiol.** 10:1511. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01511>

KNOP, D. R.; DRATHS, K. M.; CHANDRAN, S. S.; BARKER, J. L.; VON DAENIKEN, R.; WEBER, W.; FROST, J. W. Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 42, p. 10173-10182, 2001. <https://doi.org/10.1021/ja0109444>

KRELL, T; COGGINS, J.R.; LAPTHORN, A.J. The three-dimensional structure of shikimate kinase. **Journal of molecular biology**, v. 278, n. 5, p. 983-997, 1998. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1755>

LEMOS, M.; BORGES, A.; TEODÓSIO, J.; ARAÚJO, P.; MERGULHÃO, F.; MELO, L.; SIMÕES, M. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 42-51, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.011>

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic Acids Research**, p.268, 2024. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>

LIMA, F. A. Produção de biossurfactantes por *Bacillus amyloliquefaciens* IT45. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2017.62>

LI, L.; LONG, L.; DING, S. Direct Affinity-Immobilized Phenolic Acid Decarboxylase by a Linker Peptide on Zeolite for Efficient Bioconversion of Ferulic Acid into 4-Vinylguaiacol. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 39, p. 14732–14742, 2020. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03489>

LIU, H.; WANG, J.; SUN, H.; HAN, X.; PENG, Y.; LIU, J.; LIU, K.; DING, Y.; WANG, C.; DU, B. Transcriptome profiles reveal the growth-promoting mechanisms of *Paenibacillus polymyxa* YC0136 on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 584174, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584174>

LUZIATELLI, F.; BRUNETTI, L.; FICCA, A. G.; RUZZI, M. Maximizing the efficiency of vanillin production by biocatalyst enhancement and process optimization. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 279, 2019. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00279>

R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020 <https://www.r-project.org/>

MADEIRA, J. V. Potencial do mel de aroeira como conservante de alimentos: atividades antioxidante e antibacteriana. 2021. 33 f. Monografia (Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

MALHEIROS, S.V.P. Regulação do metabolismo celular—um resumo. **Revista de Ensino de Bioquímica**, v. 4, n. 1, p. 23-29, 2006. <https://doi.org/10.16923/reb.v4i1.21>

MARCHIOSI, R.; DOS SANTOS, W. D.; CONSTANTIN, R. P.; DE LIMA, R. B.; SOARES, A. R.; FINGER-TEIXEIRA, A.; MOTA, T. R.; DE OLIVEIRA, D. M.; FOLETTTO-FELIPE, M. de P.; ABRAHÃO, J.; FERRARESE-FILHO, O. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, p. 865-906, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2>

MARCUS, P.E. Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea arabica* L.). 2001. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001. <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/11270>

MARTÍNKOVÁ, L.; GRULICH, M.; PÁTEK, M.; KŘÍSTKOVÁ, B.; WINKLER, M. Bio-based valorization of lignin-derived phenolic compounds: a review. **Biomolecules**, v. 13, n. 5, p. 717, 2023. <https://doi.org/10.3390/biom13050717>

MARCATO, Danieli Camilo. **Estudo da eficácia in vitro e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética**. 2019. Tese de Doutorado. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Araraquara.

MARKAKIS, E.A., TJAMOS, S.E., ANTONIOU, P.P., PAPLOMATAS, E.J., TJAMOS, E.C. Biological control of Vorticillium wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. **BioControl** 61, 293–303. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9669-0>

MACHEROUX, P., SCHMID, J.; AMRHEIN, N., SCHALLER, A. A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. **Planta**, v. 207, p. 325-334, 1999. <https://doi.org/10.1007/s004250050489>

MIR, R., JALLU, S., & SINGH, T. P. The shikimate pathway: Review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. **Critical Reviews in Microbiology**, 41(2), 172–189. 2013. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813901>

NAKAMURA, N; HORIKOSHI, K. Purification and properties of cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic Bacillus sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 935-941, 1976. <https://doi.org/10.1080/00021369.1976.10862161>

OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M.; VARLAMOV, A.; VASKIN, Y.; EFREMOV, I.; GERMAN GREHOV, O. G.; KANDROV, D.; RASPUTIN, K.; SYABRO, M.; TLEUKENOV, T. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, n. 8, p. 1166-1167, 2012. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

PRANAV, PS, MAHALAKSHMI, B., SIVAKUMAR, R., KARTHIKEYAN, R., RAJENDHRAN, J. Análise de sequência do genoma completo de *Paenibacillus alvei* JR949 revelou clusters de genes biossintéticos que codificam novos antimicrobianos. **Curr Microbiol**. 78, 1168–1176. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02393-0>

PATOWARY, R; DEKA, H. Paenibacillus. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 339-361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00017-4>

PAZ, A. TRIGO, I.C.; TUGORES, F.; MÍGUEZ, M.; MONTAÑA, J. de la.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotransformation of phenolic compounds by Bacillus aryabhattai. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 10, p. 1671–1679, 2019 <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02163-0>

PEREIRA, R. C.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. de. Compostos fenólicos na saúde humana: do alimento ao organismo. **Lavras: Editora UFLA**, 2014. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/41377>

PRADO, C.D.do. Avaliação da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por fermentação submersa de Paenibacillus sp. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/4154>

RABELO, T.K. Propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antinociceptivas do ácido chiquímico. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016. <http://hdl.handle.net/10183/147884>

RASHMI, H.B; NEGI, P.S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. **Food Research International**, v. 136, p. 109298, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>

RAWAT, G.; TRIPATHI, P.; JAHAN, F.; SAXENA, R. K. A. A natural isolate producing shikimic acid: isolation, identification, and culture condition optimization. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, p. 2290-2302, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0150-1>

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>

SCALABRIN, E; RADAELLI, M; CAPODAGLIO, G. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 53-60, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.040>

SCHLIEP, K.P. phangorn: phylogenetic analysis in R. **Bioinformatics**, v. 27, n. 4, p. 592-593, 2011. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>

SHENG, Q.; YI, L.; ZHONG, B.; WU, X.; LIU, L.; ZHANG, B. Shikimic acid biosynthesis in microorganisms: Current status and future direction. **Biotechnology Advances**, v. 62, p. 108073, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108073>

SIBHATU, H. K.; ANURADHA JABASINGH, S.; YIMAM, A.; AHMED, S. Ferulic acid production from brewery spent grains, an agro-industrial waste. **Lwt**, v. 135, p. 110009, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110009>

TICONA, A.R.P., ULLAH, S.F., HAMANN, P.R.V. LOPES, F.A.C. *Paenibacillus barengoltzi* A1_50L2 as a Source of Plant Cell Wall Degrading Enzymes and Its Use on Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. **Waste Biomass Valor.** 12(1), 393–405 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00975-w>

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22(22), 4673-4680. 1994. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

TRIPATHI, P.; RAWAT, G.; YADAV, S.; SAXENA, R. K. Shikimic acid, a base compound for the formulation of swine/avian flu drug: statistical optimization, fed-batch and scale up studies along with its application as an antibacterial agent. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 419-431, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0340-z>

VALANCIENE, E.; JONUSKIENE, I.; SYRPAS, M.; AUGUSTINIENE, E.; MATULIS, P.; SIMONAVICIUS, A.; MALYS, N. Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 874, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10060874>

WU, S.; CHEN, W.; LU, S.; ZHANG, H.; YIN, L. Metabolic engineering of shikimic acid biosynthesis pathway for the production of shikimic acid and its branched products in microorganisms: advances and prospects. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4779, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27154779>

APÊNDICE

Apêndice 1. IDs das sequências obtidas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), assim como o gênero e a espécie das sequências utilizadas para a construção da árvore filogenética.

NR_024570.1_Escherichia_coli
NR_042091.1_Paenibacillus_alvei_DSM29
AB377108.1_Paenibacillus_alvei_AUG6
AB680069.1_Paenibacillus_alvei_NBRC3343
NR_197680.1_Paenibacillus_pedocola_TW48
NR_197678.1_Paenibacillus_silviterrae_UW52
NR_197668.1_Paenibacillus_hexagrammi_YPD9-1
NR_178606.1_Paenibacillus_cucumis_CO_4-7
NR_145888.1_Paenibacillus_faecis_CIP_101062
NR_148814.1_Paenibacillus_cathormii_BK114-2
NR_181854.1_Paenibacillus_caui_81-11
NR_181760.1_Paenibacillus_brevis_MSJ-6
NR_181769.1_Paenibacillus_allorhizosphaerae_JJ-447
NR_181636.1_Paenibacillus_tianjinensis_TB2019
NR_181417.1_Paenibacillus_farraposensis_UY79
NR_181234.1_Paenibacillus_rhizovicius_14171R-81
NR_181233.1_Paenibacillus_lycopersici_12200R-189
NR_181147.1_Paenibacillus_glycinis_T1
NR_181131.1_Paenibacillus_agri_JW14
NR_181098.1_Paenibacillus_foliorum_LMG_31456
NR_181097.1_Paenibacillus_plantarum_LMG_31461
NR_181096.1_Paenibacillus_planticolens_LMG_31457
NR_181095.1_Paenibacillus_phytorum_LMG_31458
NR_181094.1_Paenibacillus_phytohabitans_LMG_31459
NR_181093.1_Paenibacillus_germinis_LMG_31460
NR_181078.1_Paenibacillus_turpanensis_YIM_B00363
NR_181068.1_Paenibacillus_lycopersici
NR_181067.1_Paenibacillus_rhizovicius
NR_180883.1_Paenibacillus_tengchongensis_SYSU_G01003
NR_180753.1_Paenibacillus_tepidiphilus_SYSU_G01001
NR_180735.1_Paenibacillus_silvestris_5J-6

NR_180643.1_Paenibacillus_arenosi_CAU_1523
NR_180600.1_Paenibacillus_puerhi_SJY2
NR_180577.1_Paenibacillus_paridis_py1325
NR_180568.1_Paenibacillus_mesophilus_SYSU_K30004
NR_180567.1_Paenibacillus_antri_SYSU_K30003
NR_180511.1_Paenibacillus_albicerus_UniB2
NR_180498.1_Paenibacillus_roseus_MAHUQ-46
NR_180424.1_Paenibacillus_protaetiae
NR_180326.1_Paenibacillus_anseongense_MAH-34
NR_180200.1_Paenibacillus_ottowii_MS2379
NR_180162.1_Paenibacillus_paeoniae_M4BSY-1
NR_180160.1_Paenibacillus_nuruki
NR_180136.1_Paenibacillus_albiflavus_18JY21-1
NR_180094.1_Paenibacillus_flagellatus_DXL2
NR_179981.1_Paenibacillus_algicola_HB172198
NR_179779.1_Paenibacillus_sinensis_HN-1
NR_179773.1_Paenibacillus_yanchengensis_J-3
NR_179674.1_Paenibacillus_bryophyllum_L201
NR_179546.1_Paenibacillus_bouchesdurhonensis_Marseille-P3071
NR_179515.1_Paenibacillus_tuaregi_Marseille-P2472
NR_179441.1_Paenibacillus_phocaensis_mt24
NR_179437.1_Paenibacillus_senegalimassiliensis_SIT18
NR_179433.1_Paenibacillus_rubinfantis_MT18
NR_179192.1_Paenibacillus_baekrokdamisoli_Back-11
NR_179150.1_Paenibacillus_xerothermodurans_ATCC_27380
NR_179131.1_Paenibacillus_panacihumi_DCY114
NR_179128.1_Paenibacillus_montanisoli_RA17
NR_179124.1_Paenibacillus_luteus_R-3
NR_179097.1_Paenibacillus_nuruki_TI45-13ar
NR_179026.1_Paenibacillus_elymi_KUDC6143
NR_178986.1_Paenibacillus_tumae_CSA42
NR_178948.1_Paenibacillus_dokdonensis_YH-JAE5
NR_178944.1_Paenibacillus_apii_7124
NR_178867.1_Paenibacillus_xylanivorans_A59
NR_178813.1_Paenibacillus_chinensis_4R1
NR_178784.1_Paenibacillus_cymbidii_R196
NR_178782.1_Paenibacillus_esterisolvens_CFH_S0170

NR_178757.1_Paenibacillus_tibetensis_SSB001
NR_178753.1_Paenibacillus_puernese_DCY97
NR_178651.1_Paenibacillus_ferrarius_CY1
NR_178650.1_Paenibacillus_ginsengiterrae_DCY89
NR_178645.1_Paenibacillus_enshidis_RP-207
NR_178643.1_Paenibacillus_shenyangensis_A9
NR_178542.1_Paenibacillus_ihuae_GD6
NR_178529.1_Paenibacillus_alba_J20-6
NR_178528.1_Paenibacillus_swuensis_DY6
NR_178522.1_Paenibacillus_artemisiicola_MWE-103
NR_178521.1_Paenibacillus_lignilyticus_DLE-14
NR_178503.1_Paenibacillus_triticisoli_BJ-18
NR_178486.1_Paenibacillus_piscarius_P121
NR_178385.1_Paenibacillus_marinum_THE22
NR_178371.1_Paenibacillus_tezpurensis_AS-S24-II
NR_178252.1_Paenibacillus_lemnae_L7-75
NR_175540.1_Paenibacillus_oceani_IB182363
NR_175458.1_Paenibacillus_solisilvae_LAAM7113
NR_175439.1_Paenibacillus_rhizophilus_7197
NR_118419.1_Paenibacillus_macerans_WP-1
NR_041381.1_Paenibacillus_massiliensis_subsp._panacisoli
NR_173496.1_Paenibacillus_lutrae_N10
NR_171530.1_Paenibacillus_zeisoli_3-5-3
NR_170491.1_Paenibacillus_piri_MS74
NR_169482.1_Paenibacillus_thalictri_N2SHLJ1
NR_169456.1_Paenibacillus_sambharensis_SMB1
NR_169406.1_Paenibacillus_albus_18JY67-1
NR_169365.1_Paenibacillus_oralis_KCOM_3021
NR_169361.1_Paenibacillus_dakarensis_FF9
NR_169354.1_Paenibacillus_albilobatus_h2
NR_169340.1_Paenibacillus_helianthi_P26E
NR_165784.1_Paenibacillus_pinistramenti_ASL46
NR_165764.1_Paenibacillus_maysiensis_1-49
NR_165759.1_Paenibacillus_horti_MAH-16
NR_165702.1_Paenibacillus_seodonensis_DCT-19
NR_165679.1_Paenibacillus_insulae_DS80
NR_165676.1_Paenibacillus_lutimineralis_MBLB1234

NR_165669.1_Paenibacillus_psychroresistens_ML311-T8
NR_164873.1_Paenibacillus_oryzisol_1ZS3-15
NR_163642.1_Paenibacillus_mobilis_S8
NR_159910.1_Paenibacillus_translucens_CJ11
NR_159295.1_Paenibacillus_limicola_CJ6
NR_159294.1_Paenibacillus_shunpengii_YYJ7-1
NR_159286.1_Paenibacillus_xanthanilyticus_AS7
NR_159285.1_Paenibacillus_crassostreae_LPB0068
NR_159229.1_Paenibacillus_solanacearum_T16R-228
NR_159223.1_Paenibacillus_nebraskensis_JJ-59
NR_159222.1_Paenibacillus_azotifigens_NF2-4-5
NR_159149.1_Paenibacillus_albidus_Q4-3
NR_159141.1_Paenibacillus_arcticus_MME2_R6
NR_157995.1_Paenibacillus_aurantiacus_RC11
NR_157638.1_Paenibacillustritici_RTAE36
NR_108250.1_Paenibacillus_polysaccharolyticus_BL9
NR_156979.1_Paenibacillus_intestini_LAH16
NR_156905.1_Paenibacillus_lacus_Agd-32
NR_156842.1_Paenibacillus_rhizoplanae_JJ-64
NR_156978.1_Paenibacillus_apis_CBM1
NR_156153.1_Paenibacillus_qinlingensis_TEGT-2
NR_153706.1_Paenibacillus_sinopodophylli_TEGR-3
NR_152687.1_Paenibacillus_hispanicus_AMTAE16
NR_152638.1_Paenibacillus_aquistagni_11
NR_108263.1_Paenibacillus_methanolicus_BL24
NR_152053.1_Paenibacillus_silagei_LOOC204
NR_151978.1_Paenibacillus_aceti_L14
NR_151902.1_Paenibacillus_liaoningensis_LNUB461
NR_151893.1_Paenibacillus_arachidis_E3
NR_149778.1_Paenibacillus_cucumis_AP-115
NR_148839.1_Paenibacillus_periandrae_PM10
NR_148789.1_Paenibacillus_bovis_BD3526
NR_148613.1_Paenibacillus_cavernae_C4-5
NR_148618.1_Paenibacillus_marchantiophytorum_R55
NR_148320.1_Paenibacillus_herberti_R33
NR_147741.1_Paenibacillus_terreus_D33
NR_146701.1_Paenibacillus_yonginensis_DCY84

NR_146674.1_Paenibacillus_salinicaeni_LAM0A28
NR_145946.1_Paenibacillus_wenxiniae_373
NR_145634.1_Paenibacillus_panaciterrae_DCY95
NR_145868.1_Paenibacillus_zeae_6R2
NR_145628.1_Paenibacillus_kyungheensis_DCY88
NR_145625.1_Paenibacillus_yunnanensis_YN2
NR_145559.1_Paenibacillus_populi_LAM0705
NR_144710.1_Paenibacillus_antibiotiphila_GD11

Apêndice 2. Perspectivas futuras

Para dar continuidade ao estudo da produção de ácido chiquímico, com foco em aumentar sua produção e compreender melhor as enzimas envolvidas nas vias metabólicas, propõem-se as seguintes ações:

- Avaliar diferentes concentrações de glicose na formulação do meio Horikoshi, visando identificar as condições ótimas para a produção do ácido chiquímico.
- Estudar diferentes composições de meios de cultivo, explorando sua influência na produção de ácido chiquímico, na regulação das vias metabólicas e nos produtos formados, como, por exemplo, a síntese do corismato a partir do ácido chiquímico.
- Caracterizar o extrato bruto para confirmar a presença de enzimas envolvidas na via metabólica de produção do ácido chiquímico.
- Identificar e purificar enzimas de interesse, caso sejam detectadas, realizando cultivos em maior escala para posterior caracterização bioquímica.
- Explorar diferentes rotas metabólicas para a produção de metabólitos de interesse, analisando as vias metabólicas associadas ao ácido chiquímico em *Paenibacillus* sp. JAB-Hum.
- Investigar a expressão gênica das enzimas presentes na via metabólica do ácido chiquímico, por meio de análises de qPCR, para compreender a regulação diferencial de genes (up e down regulados) na síntese do composto utilizando o meio Horikoshi.
- Realizar o sequenciamento genômico do isolado de *Paenibacillus* sp. JAB-Hum, buscando informações relevantes sobre os genes envolvidos na via metabólica do ácido chiquímico e outras vias de interesse biotecnológico.
- Analisar detalhadamente os genes presentes no genoma, visando elucidar os mecanismos de regulação da via metabólica e confirmar a hipótese de acúmulo de ácido chiquímico quando o meio Horikoshi é utilizado.

- Desenhar primers específicos para amplificação de genes que codificam enzimas de interesse biotecnológico, com possibilidade de produção por meio de engenharia de proteínas recombinantes.
- Aplicar ferramentas de biologia sintética, utilizando abordagens computacionais para identificar as melhores condições de otimização da produção de ácido chiquímico em *Paenibacillus* sp. JAB-Hum.

Essas perspectivas futuras permitirão avanços significativos no entendimento e na exploração biotecnológica do ácido chiquímico, bem como das vias metabólicas associadas.

