

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/03/2025.



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

Vitória Gonçalves Navarrete

**Caracterização bioquímica e biofísica de enzima
ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção de
4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico**

São José do Rio Preto
2023

Vitória Gonçalves Navarrete

**Caracterização bioquímica e biofísica de enzima
ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção de
4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico**

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

Financiadora: bolsa CAPES e auxílio Fapesp

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

São José do Rio Preto
2023

N321c

Navarrete, Vitória Gonçalves

Caracterização bioquímica e biofísica de enzima ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção e 4-vinilguaicol a partir de ácido ferúlic / Vitória Gonçalves Navarrete. -- São José do Rio Preto, 2023

71 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Eleni Gomes

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Vitória Gonçalves Navarrete

**Caracterização bioquímica e biofísica de enzima
ácido ferúlico descarboxilase e aplicação na produção de
4-vinilguaiacol a partir de ácido ferúlico**

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

Financiadora: Financiadora: bolsa CAPES e auxílio Fapesp

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Gustavo Metzker
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Pâmela Aparecida Maldaner Pereira
UNESP – Câmpus de Jaboticabal

São José do Rio Preto
07 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo o apoio durante todas as etapas da vida, em especial à minha mãe pela amizade e parceria que temos. Agradeço também aos meus demais familiares pelos encorajamentos.

Aos meus amigos todos, em especial aos mais próximos, Maria Eduarda, Guilherme, Ingrid, João, Humberto, Amanda, Leopoldo, Loyane, Bianca, Giovana, Gabis, Monique, Ricardo e More, e à minha namorada Nathalia por estarem sempre presentes de alguma forma nas situações boas e por me ajudarem nas que não são, deixando minha caminhada mais leve. Muito obrigada.

À minha psicóloga Fran que foi essencial durante este período.

À minha orientadora pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, principalmente Gustavo, Roni e Maitê. E aos colegas e amigos feitos em outros departamentos, em especial o departamento da Física e ao Renan, que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao Ibilce por ser quase uma segunda casa.

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

RESUMO

A crescente valorização dos processos industriais sustentáveis e limitações na obtenção de alguns produtos de importância industrial têm tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais oportuna. A biossíntese de compostos permite produção contínua, sem impacto ou interferência sazonal, maior controle e otimização de parâmetros e maior especificidade dos produtos. A enzima ácido ferúlico descarboxilase (FADase) catalisa a descarboxilação não oxidativa do ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG), um composto fenólico volátil utilizado como aromatizante em alimentos e bebidas. O 4VG, composto com aroma picante de cravo, é um produto de interesse industrial cuja demanda não é suprida por fontes naturais e com alto custo de produção por via química. Com a finalidade de entender a dinâmica estrutural e parâmetros funcionais da FADase heteróloga, derivada do gene da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, para aplicação na produção de 4VG, foram realizados estudos bioquímicos e biofísicos da enzima. Para futura aplicação em processos industriais de produção, também foram realizadas tentativas de imobilização da enzima. Os testes de capacidade de conversão de AF em 4VG pela enzima purificada e em extrato bruto tiveram consumo de substrato e formação de produto foram confirmados por HPLC. A temperatura e pH ótimos determinados foram 40 °C e pH 5,5, e a faixa de estabilidade variou entre 35 °C e 50 °C e pH 5,0 a 5,5. O *melting point* de 60 °C foi determinado por *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) e a investigação de um possível estágio intermediário de desdobramento foi feito por *Circular Dichroism* (CD) nas faixas de 218 e 222nm, que apontou apenas dois estágios. A modelagem computacional da enzima possibilitou a confirmação da estrutura, seu sítio catalítico e sugeriu compatibilidade com glutaraldeído como agente reticulante a ser utilizado para imobilização. Nos ensaios de imobilização com CLEAs (*cross-linked aggregates*) e m-CLEAs (*magnetic cross-linked aggregates*), observou-se perda da atividade da enzima. Visando o entendimento deste resultado, a interação da FADase com o ligante foi analisada por espectroscopia de fluorescência, a partir da qual foram determinados dois sítios de ligação e uma constante de associação muito baixa para que a ligação fosse estável. Entretanto, estes resultados ainda são inconclusivos e novos ensaios são necessários para se definir as condições de imobilização adequadas para a enzima.

Palavras-chave: Ácido ferúlico descarboxilase. Ácido ferúlico. 4-vinilguaiacol.

ABSTRACT

The growing appreciation of sustainable industrial processes and limitations in obtaining some industrially important products have made enzymatic technology an increasingly opportune alternative. The biosynthesis of compounds allows continuous production, without seasonal interference or impact, greater control and optimization of parameters and greater product specificity. The enzyme ferulic acid decarboxylase (FADase) catalyzes the non-oxidative decarboxylation of ferulic acid (FA) to 4-vinylguaiacol (4VG), a volatile phenolic compound used as a flavoring in foods and beverages. 4VG, a compound with a spicy clove aroma, is a product of industrial interest whose demand is not met by natural sources and with a high cost of chemical production. In order to understand the structural dynamics and functional parameters of the heterologous FADase, derived from the gene of the bacterium *Klebsiella pneumoniae*, for application in the production of 4VG, biochemical and biophysical studies of the enzyme were carried out. For future application in industrial production processes, attempts were also made to immobilize the enzyme. Tests on the ability to convert FA into 4VG by the purified enzyme and crude extract had substrate consumption and product formation confirmed by HPLC. The optimal temperature and pH determined were 40°C and pH 5.5, and the stability range varied between 35 and 50°C and pH 5.0 to 5.5. The melting point of 60°C was determined by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and the investigation of a possible intermediate stage of unfolding was carried out by Circular Dichroism (CD) in the ranges of 218 and 222 nm, which identified only two stages. The computational modeling of the enzyme enabled confirmation of the structure, its catalytic site and suggested compatibility with glutaraldehyde as a cross-linking agent to be used for immobilization. In immobilization assays with CLEAs (cross-linked aggregates) and m-CLEAs (magnetic cross-linked aggregates), loss of enzyme activity was observed. Aiming at understanding this result, the interaction of the FADase with the ligand was analyzed by Fluorescence Spectroscopy, from which two binding sites and a very low association constant were determined for the binding to be stable. However, these results are still inconclusive and new tests are needed to define the appropriate immobilization conditions for the enzyme.

Keywords: Ferulic acid decarboxylase. Ferulic acid. 4-vinylguaiacol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do ácido ferúlico.	15
Figura 2 – Síntese do ácido ferúlico em plantas.	17
Figura 3 – Metabolismo de AF em outros compostos aromáticos pela bactéria <i>Bacillus coagulans</i> proposta por Karmakar e colaboradores.	19
Figura 4 – Fórmula molecular do 4-vinilguaiacol.	20
Figura 5 – Gel de poliacrilamida para detecção das bandas de FADase.	35
Figura 6 – Cromatogramas dos padrões de AF e 4VG, com tempo de retenção de cerca de 6,5 min e 11,5 min.	37
Figura 7 – Cromatograma de amostra analisada por CLAE para exemplo da identificação e quantificação dos compostos AF e 4VG a partir dos padrões, com tempo de retenção de cerca de 6,5 min e 11,5 min.	38
Figura 8 – Curva de tempo de reação da enzima FADase com a finalidade de encontrar o tempo de reação mais eficiente para conversão de ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG) e comparação da conversão de AF em 4VG utilizando a enzima purificada (P) e o extrato bruto (B).	38
Figura 9 – Teste de estabilidade da enzima FADase pura à diferentes temperaturas	39
Figura 10 – Teste de atividade da enzima FADase pura em diferentes faixas de pH.	40
Figura 11 – DSC para determinação de <i>melting point</i> e investigação de estágio intermediário na enzima FADase.	41
Figura 12 – CD com variação de temperatura de 35°C a 70°C a 218 nm para averiguação de mudança conformacional de folhas β -pregueadas para análise de indicativo de estágio intermediário da enzima FADase.	42
Figura 13 – CD com variação de temperatura de 35°C a 70°C a 222 nm para averiguação de mudança conformacional de α -hélices para análise de indicativo de estágio intermediário da enzima FADase.	42
Figura 14 – Comparação das estruturas da enzima utilizando Alphafold Multimer (magenta e amarela) e a plataforma Swissmodel (verde e ciano).	43
Figura 15 – Valores de IDDT para cada resíduo em cada modelo gerados por AlphaFold. A linha vertical indica o fim de uma cadeia e começo da outra. Valores maiores de 80 indicam alta confiabilidade do modelo.	45

Figura 16 – Erro de alinhamento predito. Indica o erro esperado nas posições relativas de pares de resíduos nos cinco modelos de dímeros gerados. Regiões em azul indicam alta confiança.	45
Figura 17 – Número de sequências homólogas abrangendo diferentes % de identidade (barra à direita) com a sequência alvo. As linhas dentro do gráfico estão coloridas de acordo com a legenda de cores.	46
Figura 18 – Alinhamento da sequência alvo com o molde (PDB 4UU2).	46
Figura 19 – Valor de Z-score para o modelo gerado por homologia.	47
Figura 20 – Gráfico de Ramachandran para os ângulos diedros Phi (eixo x) e Psi (eixo y) no modelo.	48
Figura 21 – Similaridade local com o molde. O eixo x representa os resíduos de aminoácidos e o eixo y representa a similaridade local com o molde.	48
Figura 22 – Representação estrutural da enzima mostrando em <i>sticks</i> os resíduos catalíticos.	49
Figura 23 – Atividade relativa da enzima FADase em diferentes tentativas de imobilização.	59
Figura 24 – Espectro de emissão de fluorescência da supressão da atividade da enzima FADase pela adição de glutaraldeído.	60
Figura 25 – Gráfico de duplo-log gerado a partir dos dados obtidos da supressão de fluorescência nas temperaturas de 2°C, 4°C e 6°C.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre os precipitantes em diferentes concentrações adicionados à solução de enzima pura (EP) e extrato bruto (EB) a partir da quantidade de 4VG formado (mg L^{-1}).	41
Tabela 2 – Número de sítios de ligação e constante de associação da interação FADase-glutaraldeído.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4VG	4-vinilguaiaicol
AF	Ácido ferúlico
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FADase	Ácido Ferúlico Descarboxilase
IPTG	isopropil- β -D-thiogalactopiranoside
LB	Lúria Bertani
min	Minutos
PEG	Polietilenoglicol

LISTA DE SÍMBOLOS

mM	Milimolar
µg	Micrograma
mL	Miligrama
°C	Graus Celsius
nm	Nanômetros
g	Gramas
(v/v)	(Volume de Soluta)/(Volume de Solução)
rpm	Rotações Por Minuto
mmol	Milimol
L⁻¹	Por Litro
(w/v)	(Peso)/(Volume)
µL	Microlitro
U	Unidade de Atividade
µmol	Micromol

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Ácido ferúlico	15
2.1.1 Características do composto	15
2.1.2 Fontes naturais de ácido ferúlico	16
2.1.3 Bioconversão de ácido ferúlico em 4-vinilguaiacol	18
2.2 4-vinilguaiacol	19
2.3 Ácido ferúlico descarboxilase	21
2.4 Imobilização enzimática	22
3 OBJETIVOS GERAIS	23
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO II	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Experimentação <i>in vitro</i>	30
3.1.1 Microrganismo	30
3.1.2 Obtenção do extrato enzimático	30
3.1.3 Purificação da enzima	31
3.1.4 Estimativa da massa molecular da enzima	31
3.1.5 Determinação da atividade da enzima	32
3.1.6 Estabilidade em variação de temperatura e pH	32
3.1.7 Especificidade da ácido ferúlico descarboxilase	33
3.1.8 Teste de precipitante	33
3.1.9 Determinação do <i>melting point</i> por DSC (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)	33
3.1.10 Investigação dos estágios de desenovelamento da FADase heteróloga por CD (<i>Circular Dichroism</i>)	34
3.2 Métodos analíticos	34
3.2.1 Determinação de proteínas totais	34

3.2.2	Análise dos compostos por cromatografia	34
3.3	Experimentação <i>in silico</i> – Modelagem computacional	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Produção, purificação e quantificação de FADase	35
4.2	Determinação da atividade da FADase heteróloga	36
4.2.1	Tempo de conversão de AF em 4VG	36
4.2.2	Estabilidade em variação de temperatura e pH	39
4.3	Teste de especificidade	40
4.4	Teste de precipitante	40
4.5	Determinação do <i>melting point</i> por DSC (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)	41
4.6	Investigação dos estágios de desenovelamento da FADase heteróloga por CD (<i>Circular Dichroism</i>)	42
4.7	Modelagem	43
4.7.1	Modelos estruturais da FADase	43
4.7.2	Modelos estruturais da FADase gerados por AlphaFold	44
4.7.3	Modelo estrutural da FADase gerado por homologia	46
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	CAPÍTULO III	54
1	INTRODUÇÃO	56
2	OBJETIVO ESPECÍFICO	57
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	Imobilização enzimática	57
3.2	Determinação da atividade da enzima	58
3.3	Análise dos compostos por cromatografia	58
3.4	Investigação da interação enzima-ligante por espectroscopia de fluorescência	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	62
	CAPÍTULO IV	64
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

APÊNDICE A - Curvas dos padrões de AF e 4VG feitas a partir da quantificação por CLAE e utilizadas para quantificação dos compostos nas amostras	65
APÊNDICE B - Tabela com dados de capacidade de conversão de FADase heteróloga purificada e em extrato bruto obtidos por CLAE	66
APÊNDICE C - Tabela com dados de estabilidade de FADase heteróloga incubada por 60min à diferentes temperaturas obtidos por CLAE	67
APÊNDICE D - Tabela com dados de tolerância de FADase heteróloga à alteração de pH do substrato de obtidos por CLAE	67
APÊNDICE E - Tabela com dados do teste de precipitantes	68
APÊNDICE F - Tabela com as titulações de glutaraldeído (GL.) feitas na análise da interação enzima-ligante por espectroscopia de fluorescência nas temperaturas de 2°C, 4°C e 6°C.	69
APÊNDICE G - Tabela com dados de intensidades obtidas por análise de supressão por espectroscopia de fluorescência.	70
ANEXO A - Supressão de fluorescência	71

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

A tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais oportuna em processos industriais sustentáveis e para suprir as limitações na obtenção de produtos de importância industrial por técnicas de extração natural ou por síntese química (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020; SOUZA et al., 2017). A biossíntese de compostos pode ser mais interessante do ponto de vista econômico em comparação aos processos de extração a partir de produtos naturais, visto que permite produção contínua, sem impacto ou interferência sazonal, maior controle e otimização de parâmetros e maior quantidade dos produtos. Entre os métodos de síntese, aqueles por via enzimática permitem maior especificidade do produto, além de ser mais amigável sob o ponto de vista ambiental (BETTIO, 2020).

A ácido ferúlico descarboxilase (FADase) (EC 4.1.1.102) é uma enzima da família das liases capaz de catalisar a descarboxilação não oxidativa do ácido ferúlico (AF) em 4-vinilguaiacol (4VG), um composto fenólico volátil muito utilizado em alimentos e bebidas por possuir o aroma picante de cravo (LI; LONG; DING, 2019; SUN et al, 2018). O 4VG é um composto de interesse industrial que não tem sua demanda suprida por fontes naturais e tem alto custo de produção por via de síntese química (SANTOS, 2018; SUN et al, 2018).

As descarboxilases independentes de cofatores externos, como a FADase, são candidatas promissoras para o bioprocessamento de produção de 4VG e seus derivados, e são disponíveis a partir da produção heteróloga em *Escherichia coli* (*E. coli*), no contexto de aplicação industrial, apesar serem expressadas de forma nativa em diversos microrganismos, principalmente bactérias (DETERING; MUNDRY; BERGER, 2020; SANTOS, 2018; GU et al., 2011).

O 4VG possui um limiar de detecção extremamente baixo, em torno de 0,30 ppm e apresenta um aroma bastante persistente mesmo em pequenas concentrações, o que aumenta o valor agregado do produto (MEILGAARD, 1975). O composto também apresenta crescente valor medicinal devido à sua possível atividade anticâncer e atividade antioxidante, assim como uso na indústria cosmética, farmacêutica e química (LUO et al., 2021; LI; LONG; DING, 2019; TAŃSKA; MIKOŁAJCZAK; KONOPKA, 2018).

O AF, substrato da reação, pode ser extraído de resíduos lignocelulósicos, uma fonte sustentável e de baixo custo. Por ser um dos compostos fenólicos mais abundantes nestes resíduos, livre ou ligados covalentemente aos biopolímeros de hemicelulose e lignina, o AF pode ser extraído de bagaço de cana de açúcar por meio de hidrólise alcalina, sendo uma fonte barata e acessível do precursor do 4VG (AL ARNI, 2018; SANTOS, 2018). A extração do ácido ferúico requer a dissociação da hemicelulose e lignina, a qual requer combinação de processos químicos, físicos e biológicos devido à resistência natural das paredes das células vegetais. A fração de lignina obtida é chamada de líquor, um líquido rico em compostos aromáticos (SANTOS, 2018; ROOPAN, 2017).

Diferentemente da alta disponibilidade do AF em resíduos lignocelulósicos, a quantidade de 4VG disponível nas plantas é muito limitada, o que não atende o aumento da demanda de consumo mundial (SANTOS, 2018; SUN et al, 2018). Atualmente, a maior parte do 4VG é produzida por síntese química de alto custo de produção devido ao elevado preço do AF obtido de forma sintética por processos químicos (SAEED et al., 2019; SANTOS, 2018; SUN et al, 2018). Desse modo, a extração do ácido ferúico a partir de bagaço de cana de açúcar e sua subsequente transformação por via enzimática a 4VG, além de ser um método ambientalmente mais seguro, faz do 4VG um produto natural, com maior valor agregado.

O presente trabalho está inserido num projeto maior do grupo de pesquisa que visa o desenvolvimento de métodos de extração de ácido ferúico a partir de bagaço de cana e busca detectar, isolar e produzir a FADase e aplicá-la na biotransformação do AF a 4VG. Este estudo teve por objetivos entender a dinâmica estrutural e parâmetros funcionais para aplicação da FADase na produção de 4VG, utilizando ensaios bioquímicos e biofísicos com uma FADase produzida por *Klebsiella pneumoniae*, clonada em *E. coli*. Ainda, busca na imobilização da FADase melhoria do desempenho, estabilidade e atividade da enzimas para aplicação industrial e produção em larga escala através de protocolos utilizando CLEAs e m-CLEAs.

REFERÊNCIAS

BETTIO, G., 2020. **Avaliação da bioconversão de ácido ferúlico em aromas vaniloides por leveduras isoladas da biodiversidade latino-americana**. Tese Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAVANAGH, J.; FAIRBROTHER, W. J.; PALMER III, A. G.; SKELTON, N. J., 1996. **Protein NMR spectroscopy: principles and practice**. Academic press.

CUI, J.; ZHAO, Y.; FENG, Y.; LIN, T.; ZHONG,; C. TAN, Z.; JIA, S., 2017. Encapsulation of spherical cross-linked phenylalanine ammonia lyase aggregates in mesoporous biosilica. **Journal of agricultural and food chemistry**, 65(3), pp.618-625.

DETERING, T.; MUNDRY, K.; BERGER, R. G., 2020. Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. **PloS one**, 15(12), p.e0244290.

FURLANI, I. L.; AMARAL, B. S.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B., 2020. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, 43(4), pp.463-473.

GU, W.; YANG, J.; LOU, Z.; LIANG, L.; SUN, Y.; HUANG, J.; YI, X. L.; ZHAOHUI, C. M.; ZHANG, K. Q., 2011. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter sp.* Px6-4. **PloS one**, 6(1), e16262.

GU, W.; LI, X.; HUANG, J.; DUAN, Y.; MENG, Z.; ZHANG, K. Q.; YANG, J., 2011. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter sp.* Px6-4 gene for ferulic acid decarboxylase. **Applied microbiology and biotechnology**, 89(6), pp.1797-1805.

LACKEWICZ, J. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 1983.

LI, L.; LONG, L.; DING, S., 2019. Bioproduction of high-concentration 4-vinylguaiacol using whole-cell catalysis harboring an organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus atrophaeus*. **Frontiers in microbiology**, 10, p.1798.

LUO, Y.; WANG, C. Z.; SAWADOGO, R.; YUAN, J.; ZENG, J.; XU, M.; TAN, T.; YUAN, C.S., 2021. 4-Vinylguaiacol, an Active metabolite of ferulic acid by enteric microbiota and probiotics, possesses significant activities against drug-resistant human colorectal cancer cells. **ACS Omega**.

PEDRO, R. P., 2019. **Caracterização biofísica da interação entre o domínio SH3 C-Terminal da Grb2 com cumarina**. Dissertação de Mestrado em Biofísica Molecular – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto.

SHELDON, R. A., 2011. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied microbiology and biotechnology**, 92(3), pp.467-477.

SHELDON, R. A.; SORGEDRAGER, M. J.; KONDOR, B., 2016. Clea Technologies BV. **Non-leachable magnetic cross-linked enzyme aggregate**. U.S. Patent 9,353,367.

SOUZA, L. T.; VERÍSSIMO, L. A.; PESSELA, B. C.; SANTORO, R. R.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A., 2017. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, 4, pp.529-568

SUN, L. H.; LV, S. W.; YU, F.; LI, S. N.; HE, L. Y., 2018. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of biotechnology**, 281, pp.144-149.

TAŃSKA, M.; MIKOŁAJCZAK, N.; KONOPKA, I., 2018. Comparison of the effect of sinapic and ferulic acids derivatives (4-vinylsyringol vs. 4-vinylguaiacol) as antioxidants of rapeseed, flaxseed, and extra virgin olive oils. **Food chemistry**, 240, pp.679-685.

TURAL, B.; ŞİMŞEK, İ.; TURAL, S.; ÇELEBI, B.; DEMIR, A. S., 2013. Carbonylation reactivity of benzaldehyde lyase (BAL, EC 4.1. 2.38) covalently attached to magnetic nanoparticles. **Tetrahedron: Asymmetry**, 24(5-6), 260-268.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos estudos realizados no presente trabalho foi possível obter informações sobre as características bioquímicas e biofísicas da enzima FADase bacteriana heteróloga, produzida a partir do gene de uma bactéria *K. pneumoniae* expresso em *E. coli*, e estabelecer alguns parâmetros para sua aplicação na produção de 4VG a partir de AF.

Dentre os resultados observados, temos que é possível utilizar o extrato bruto de expressão da FADase para produção de 4VG, uma forma economicamente mais viável considerando a produção em larga escala pelo menor custo de produção. Também foi estabelecida a tolerância da enzima apenas na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 e perda de atividade em temperaturas superiores a 50°C, com *melting point* em 60°C.

A enzima apresentou atividade em substratos análogos de AF, o que motiva mais estudos a respeito do seu emprego na produção de 4-vinil derivados, e demonstrou bons resultados com o uso dos precipitantes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e PEG.

Quanto à imobilização da enzima, apesar dos modelos gerados *in silico* sugerirem estrutura favorável a utilização de glutaraldeído como agente reticulante devido a grande quantidade de resíduos de lisina, nos estudos *in vitro* a atividade enzimática cessou em todos os testes de imobilização.

A constante de associação (K_a) entre a enzima e o glutaraldeído é extremamente baixa, o que indica ligação instável. A instabilidade da ligação ainda pode sugerir competição entre o ligante e o substrato (AF), o que pode explicar o cessar da atividade enzimática de consumo de AF e produção de 4VG da enzima FADase na presença de glutaraldeído.

Os resultados obtidos elucidam características estruturais e funcionais da enzima e preconizam futuros estudos acerca de estratégias para aplicação da FADase bacteriana heteróloga na produção de 4VG.