



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

Lara Maria Biancheti

**Produção de vanilina por bactérias cultivadas em hidrolisados de
bagaço de cana-de-açúcar pré tratados com ozonólise.**

São José do Rio Preto
2022

Lara Maria Biancheti

**Produção de vanilina por bactérias cultivadas em hidrolisados de
bagaço de cana-de-açúcar pré tratados com ozonólise.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes.
Linha de Pesquisa: Bioprodutos – Produção e Aplicação em Microrganismos.

São José do Rio Preto
2022

B577p

Biancheti, Lara Maria

Produção de vanilina por bactérias cultivadas em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pré tratados com ozonólise. / Lara Maria Biancheti. -- São José do Rio Preto, 2022

63 f. : il., tabs., fotos

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

Orientadora: Eleni Gomes

1. Microbiologia industrial. 2. Microbiologia química. 3. Microbiologia agrícola. 4. Bioquímica. 5. Ozonólise. 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.

Lara Maria Biancheti

Produção de vanilina por bactérias cultivadas em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pré tratados com ozonólise.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
USP – São Paulo

Prof^a. Dr.^a Andrea Carla da Silva Barreto
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
01 de julho de 2022

À minha mãe por ter me ensinado
que não há nada que não possa ser
compreendido.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda força, dedicação e encorajamento me dado todos os dias. Por não terem me deixado desistir nem abater frente as dificuldades da pesquisa no Brasil, principalmente durante uma pandemia mundial.

Ao meu irmão, Lorenzo, por sua curiosidade, fé e interesse em tudo que a ciência pode fornecer em conhecimento e inovação. Mesmo sem saber, sua bisbilhotice de criança iluminou meus dias e trajetória.

Aos meus colegas de vida e laboratório: muito obrigada por tudo. Sem vocês, nossas conversas, convivência e trocas de informações, estes dois anos não seriam os mesmos.

À minha orientadora, prof.^a Eleni, pelo apoio, orientação, oportunidade e amizade. Admiração e respeito à mulher que é e ao que representa aos seus alunos.

Aos queridos Dr. Sergio Gomez Alonso e Dr. José Pérez Navarro por terem me recebido na Universidad de Castilla La-Mancha para meu estágio, onde realizei as análises deste trabalho, e terem a paciência e boa vontade de me ensinarem.

Ao Prof. Octavio, *a.k.a.* grande Vico, por seu entusiasmo, amor e respeito pela cana-de-açúcar que, sem dúvida, me contaminaram e engrandeceram esta caminhada.

Ao Ibilce e seus funcionários, pelo acolhimento, estrutura e ambiente cheio de possibilidades. Obrigada!

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

“It's the questions we can't answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he'll look for his own answers.”

Patrick Rothfuss (2011, p. 545)

RESUMO

A cultura de cana-de-açúcar para produção de açúcar e álcool é a maior geradora de resíduos agrícolas do Brasil. A principal dificuldade no uso dos resíduos lignocelulósicos em biotecnologia é a complexidade de suas estruturas havendo necessidade de tratamentos específicos para a desconstrução dessa organização estrutural, sendo a lignina o composto responsável pela maior parte da resistência à degradação química e biológica da fibra do bagaço. Os tratamentos químicos, como a hidrólise ácida ou alcalina, são os mais utilizados pela indústria, porém, a de pré-tratamentos aumentam a eficiência da hidrólise. Entre os agentes oxidantes químicos, o ozônio é o que possui maior reatividade sobre as substâncias com grupos funcionais com alta densidade eletrônica, incluindo aqui as ligações de alcenos, tais como aquelas amplamente presentes em lignina, tendo como vantagens a bioconversão efetiva da lignina em seus compostos derivados; não produção de resíduos tóxicos e o fato de que as reações podem ser realizadas à temperatura e pressão ambiente. O presente trabalho visou testar a ozonólise como mecanismo de pré-tratamento do material lignocelulósico de modo a empregá-lo, por meio da biotransformação mediada por microrganismos, na produção de vanilina, substância de grande interesse comercial com aplicação nas indústrias alimentícia, farmacológica e química. Verificamos que o tratamento foi eficiente e que seus compostos derivados conseguiram ser convertidos em vanilina através do metabolismo bacteriano. A produção por *Micrococcus luteus* chegou a 145 mg/L às 10 horas de cultivo com compostos derivados do tratamento hidrotérmico, demonstrando um grande potencial de se obter compostos de importância econômica, como vanilina e acetovanilona, a partir de bagaço de cana hidrolisado usando cultivo microbiano. Além disso, outras substâncias foram geradas a partir do pré tratamento de ozônio, como o ácido ferúlico (52 mg/L) e ácido cumárico (149 mg/L), que podem ser utilizadas tanto como produtos finais, quanto como precursoras na produção de outros compostos na indústria.

Palavras-chave: Ozonólise. Lignina. Acetovanilona. Vanilina. Cana-de-açúcar. Ácido ferúlico.

ABSTRACT

The cultivation of sugarcane for the production of sugar and alcohol is the largest generator of agricultural waste in Brazil. The main difficulty in the use of lignocellulosic residues in biotechnology is the complexity of their structures, requiring specific treatments to deconstruct this structural organization, with lignin being the compound responsible for most of the resistance to chemical and biological degradation of bagasse fiber. Chemical treatments, such as acid or alkaline hydrolysis, are the most used by the industry, however, pre-treatments increase the hydrolysis efficiency. Among the chemical oxidizing agents, ozone is the one with the highest reactivity on substances with functional groups with high electron density, including here the alkene bonds, such as those widely present in lignin, with the advantages of effective bioconversion of lignin into its compounds. derivative compounds; no production of toxic residues and the fact that the reactions can be carried out at ambient temperature and pressure. The present work aimed to test ozonolysis as a pre-treatment mechanism of lignocellulosic material in order to use it, through biotransformation mediated by microorganisms, in the production of vanillin, a substance of great commercial interest with application in the food, pharmacological and chemical industries. We verified that the treatment was efficient and that its derivative compounds were able to be converted into vanillin through bacterial metabolism. The production by *Micrococcus luteus* reached 145 mg/L at 10 hours of cultivation with compounds derived from the hydrothermal treatment, demonstrating a great potential to obtain compounds of economic importance, such as vanillin and acetovanilone, from hydrolyzed sugarcane bagasse using microbial culture. In addition, other substances were generated from the ozone pretreatment, such as ferulic acid (52 mg/L) and coumaric acid (149 mg/L), which can be used both as final products and as precursors in the production of other compounds in the industry.

Keywords: Ozonolysis. Lignin. Acetovanillone. Vanillin. Sugar cane. Ferulic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema de ozonólise de alcenos pelo Mecanismo de Criegee. 17
- Figura 2 – (a) Resultado da avaliação da concentração de ozônio. À esquerda 21
o TRAP A (recipiente 1) e a direita o TRAP B (recipiente 2), com suas
respectivas diferenças de coloração devido à quantidade de ozônio recebida.
(b) Esquema para execução de ozonólise. Pode-se observar a cânula do
aparelho de ozonólise ligado ao Evaporador Rotativo 120, que está com seu
aquecimento desligado, injetando o ozônio no balão volumétrico contendo
bagaço de cana-de-açúcar e rotacionando de forma que a injeção seja
uniforme sobre a amostra.
- Figura 3 – Sistema HPLC-DAD-Q-ToF Dual AJS-ESI localizado no 27
Departamento de Química Analítica e Tecnologia de Alimentos da
Universidad de Castilla La-Mancha, Ciudad Real – Espanha.
- Figura 4 – Cultivo de *B. cereus* em meios contendo compostos derivados de 29
cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise por 10 minutos seguida por
extração hidrotérmica em concentrações de 10 ou 50%.
- Figura 5 – Cultivo de *B. cereus* em meios contendo compostos derivados de 32
cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise por 10 minutos seguida por
extração alcalina em concentrações de 10 ou 50%.
- Figura 6 – Cultivo de *M. luteus* em meios contendo compostos derivados de 33
cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise por 10 minutos seguida por
extração hidrotérmica em concentrações de 10 ou 50%.
- Figura 7 – Cultivo de *M. luteus* em meios contendo compostos derivados da 34
cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise seguida por extração alcalina em
concentrações de 10 ou 50%.
- Figura 8 – Quantificação dos compostos nos extratos de bagaço de cana de 36
açúcar tratados com ozonólise por 10 ou 30 minutos e extraídos com água
ou NaOH. Valores expressados em mg/L.
- Figura 9 – Visão geral da concentração de compostos para culturas de *M.* 37
luteus com licores extraídos hidrotérmicamente e submetidos a ozonólise por
10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou 50% de concentração do licor.
Valores expressos em mg/L.

- Figura 10 – Esquema da produção de vanilina através de diferentes rotas. A 40
vanilina é mostrada originando-se de duas rotas mecanicamente diferentes:
diretamente do ácido cumárico por encurtamento não oxidativo da cadeia, ou
através de qualquer um dos três ésteres de coenzima A por β -oxidação.
- Figura 11 – Visão geral da concentração de compostos para culturas de *B. cereus* 42
cereus com licores extraídos hidrotérmicamente e submetidos a ozonólise
por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou 50% de concentração do
licor. Valores expressos em mg/L.
- Figura 12 – Visão geral da concentração de compostos para cada uma das 45
culturas de *M. luteus* cultivadas com licores extraídos com NaOH e
submetidos a ozonólise por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou
50% de concentração do licor. Valores expressos em mg/L.
- Figura 13 – Visão geral da concentração de compostos para cada uma das 46
culturas de *B. cereus* cultivadas com licores extraídos com NaOH e
submetidos a ozonólise por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou
50% de concentração do licor. Valores expressos em mg/L.
- Figura 14 – Concentração de vanilina (mg/L) em cultivados preparados com 48
10 ou 50% de licores extraídos com H₂O.
- Figura 15 – Concentração de vanilina (mg/L) em cultivados preparados com 49
licores extraídos com NaOH.
- Figura 16 – Concentração de ácido p-cumárico (mg/L) em cultivados 51
preparados com licores extraídos com H₂O.
- Figura 17 – Concentração de ácido p-cumárico (mg/L) em cultivados 52
preparados com licores extraídos com NaOH.
- Figura 18 – Concentração de ácido ferúlico (mg/L) em cultivados preparados 54
com licores extraídos com H₂O.
- Figura 19 – Concentração de ácido ferúlico (mg/L) em cultivados preparados 55
com licores extraídos com NaOH.
- Figura 20 – Concentração de acetovanilona (mg/L) em cultivados preparados 57
com licores extraídos com H₂O.
- Figura 21 – Concentração de acetovanilona (mg/L) em cultivados preparados 58
com licores extraídos com NaOH.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas bacterianas utilizadas	20
Tabela 2 – Nomenclatura neste trabalho, nomes IUPAC e massas molares dos compostos analisados.	25
Tabela 3 – Compostos analisados e suas respectivas concentrações, tempos de retenção e R ² .	28

LISTA DE SÍMBOLOS

kg	Quilograma
t	Tonelada
m/v	Massa por volume
mm	Milímetro
°C	Graus Celsius
rpm	Rotação por minuto
nm	Nanometro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
N	Normalidade
L	Litro
g	Gramma
M	Molaridade
atm	Atmosfera
µL	Microlitro
g (G)	Força gravitacional
µm	Micrometro
v/v	Volume por volume
m/z	Razão carga-massa
psi/min	Libra-força por polegada quadrada por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos Gerais	19
3.2 Objetivos Específicos	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Microrganismos	20
5.2 Meio de cultura	20
5.3 Resíduos lignocelulósicos de cana-de-açúcar	20
5.4 Definição das condições adequadas para o cultivo das cepas	21
5.4.1 Obtenção dos inóculos	21
5.4.2 Condições utilizadas no cultivo	21
5.5 Ozonólise	21
5.6 Tratamento alcalino	23
5.7 Tratamento hidrotérmico	23
5.8 Ensaio para avaliação da tolerância das cepas aos compostos derivados da ozonólise do bagaço da cana-de-açúcar	24
5.9 Cultivo para avaliação da produção de vanilina nos compostos provenientes da ozonólise	24
5.10 Métodos analíticos	25
5.10.1 Padrões analíticos	25
5.10.2 Preparação das amostras para análise cromatográfica	26
5.10.3 Análise cromatográfica	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1 Avaliação de tolerância aos compostos derivados dos pré-tratamentos	28
6.2 Análises cromatográficas	35
6.2.1 Extratos	35
6.2.2. Cultivos dos microrganismos em hidrolisados hidrotérmico e alcalino de bagaço submetido a ozonólise	37
6.2.3. Compostos	47
7. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

Diversos produtos utilizados nas indústrias alimentícia, química e de biocombustíveis têm como fonte a biomassa lignocelulósica. Ela pode ser obtida em coprodutos gerados na indústria agrícola, conhecidos como resíduos agroindustriais, embora este não seja um termo empregado atualmente, pois em função dessa ampla possibilidade de uso, são considerados coprodutos. O uso de coprodutos na fabricação de substâncias finas para o mercado representa uma produção com menor custo e, geralmente, mais ambientalmente seguras, com consequente diminuição dos resíduos gerados em toda cadeia produtiva industrial e agrícola (PIRES et al., 2008).

A cultura de cana-de-açúcar é a maior geradora de coprodutos do Brasil (IPEA, 2009). A estimativa de produção da safra 2020/21 é de 654,5 milhões de toneladas (CONAB, 2021), destes, cerca de 280 kg/t são de bagaço (ALCARDE, 2020), totalizando cerca de 183 milhões de toneladas do resíduo. Atualmente o bagaço é muito utilizado na geração de energia elétrica, porém apesar da considerada uma fonte de limpa e excelente alternativa às hidrelétricas, seu uso ainda pode levar a outros bioprocessos e geração de produtos de alto valor agregado (DIAS et al., 2013).

Há anos, pesquisas vêm buscando desenvolver processos que permitam a obtenção de açúcares através dos polissacarídeos celulose e hemicelulose presentes na biomassa vegetal para diversos fins (CHUNDAWAT et al., 2011). Todavia, outro constituinte da biomassa, a lignina não tem tido tanto destaque: por ser um heteropolímero aromático, geralmente é subutilizada devido à complexidade dos compostos liberados pelos processos oxidativos aplicados em sua fragmentação (SANTOS, 2018). Antes da utilização da biomassa lignocelulósica, ela precisa ser submetida a tratamentos químicos e/ou físicos para alterarem a organização estrutural que lhe confere recalcitrância química e biológica. Esses tratamentos resultam na remoção da lignina e separação dos polímeros de açúcar (ROOPAN, 2017). Posteriormente os polissacarídeos podem ser utilizados para a produção de etanol 2G e outros compostos, e a lignina, como matéria-prima para reações de síntese de produtos de interesse comercial, industrial e farmacológico.

Desse modo, o desenvolvimento de tecnologia para extração e despolimerização da lignina e a bioconversão dos seus derivados em bioprodutos

elevariam o potencial de uso de biomassa lignocelulósica e traria mais produtividade ao sistema de biorefinarias.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial de modificação estrutural da lignina do bagaço de cana de açúcar pela ozonólise seguida de extração hidrotérmica ou extração alcalina e utilizar os compostos liberados por esses tratamentos como substrato para biotransformação bacteriana à vanilina.

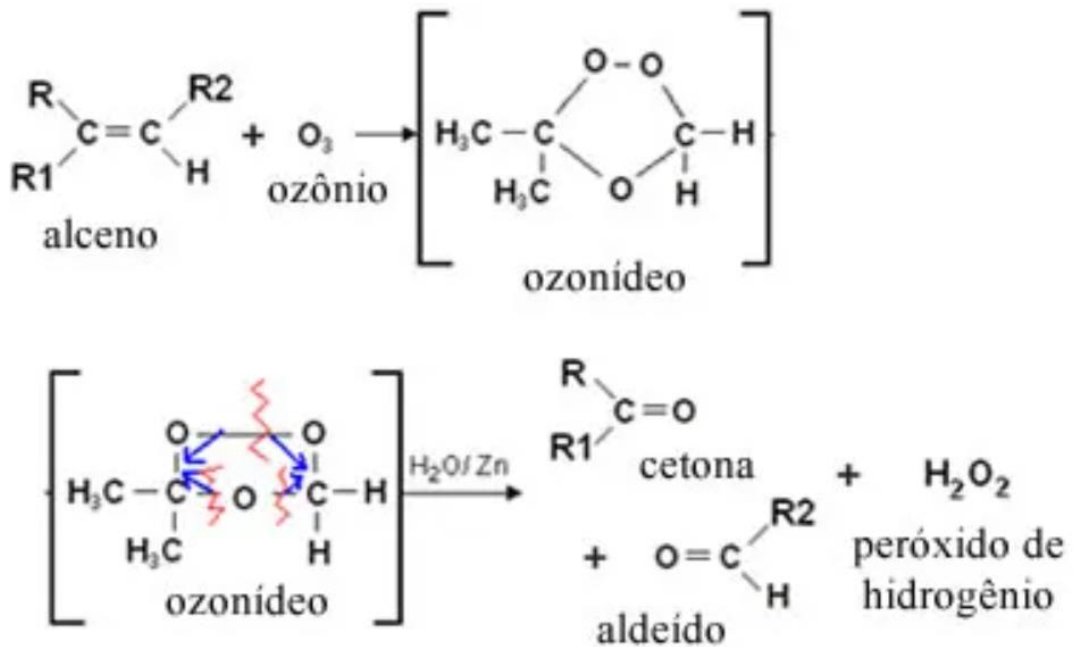
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O ozônio é o oxidante que possui maior reatividade sobre substâncias com grupos funcionais de alta densidade eletrônica (SILVA, 2013), sendo capaz de oxidar a maioria dos compostos orgânicos, mas reagindo principalmente com alcenos através do mecanismo Criegee (Figura 1) (CRIEGEE, 1975). Graças a essa característica, as diferenças entre lignina e carboidratos, no que diz respeito à sua configuração eletrônica (ligações duplas e centros doadores de elétrons presentes na lignina), permitem que o ozônio atue de forma seletiva e 100 vezes mais rápido sobre a lignina do que sobre carboidratos (MAIA & COLODETTE, 2003). O ozônio ataca as ligações duplas, gerando substâncias solúveis de baixa massa molar, como alguns ácidos orgânicos, podendo alterar o pH do meio reacional de 6,5 a 2. (CONTRERAS IGLESIAS, 2003). Portanto, a degradação dos materiais lignocelulósicos por ozonólise, incluindo o bagaço de cana-de-açúcar, é essencialmente limitada à lignina, sendo a hemicelulose levemente atacada e a celulose não afetada (SUN & CHENG, 2002; GONÇALVES, 2009). Essa especificidade de ação do ozônio é uma grande vantagem em processos que necessitam da separação da lignina do restante dos componentes do material lignocelulósico. A ozonólise tem como vantagens a bioconversão efetiva da lignina em seus compostos derivados, a não geração de resíduos tóxicos para os processos subsequentes e o fato de que as reações podem ser realizadas à temperatura e pressão ambiente. No entanto, o processo usando ozonólise tende a ter custo mais elevado pois é necessária uma grande quantidade de ozônio (SUN & CHENG, 2002).

A maioria dos trabalhos de referência do mecanismo de pré-tratamento com ozônio são relacionados com o processo de branqueamento da madeira em indústrias

de papel e celulose e tratamentos de água (CHANDRAKANTH et al., 1996; HENG et al., 2007; KLEISER & FRIMMEL, 2000).

Figura 1. Esquema de ozonólise de alcenos pelo Mecanismo de Criegee.



Fonte: Jennifer Rocha Vargas Fogaça.

Outro pré-tratamento muito utilizado com esta finalidade é o hidrotérmico alcalino (álcali ou apenas alcalino também são termos empregados), devido à sua capacidade de desestruturar as ligações da lignina e, até certo ponto, hidrolisar as hemiceluloses. As bases mais empregadas são os hidróxidos de sódio (NaOH), potássio (KOH), cálcio (Ca(OH)₂) e amônio (NH₄OH) (SUN & CHENG, 2002). O tratamento alcalino utiliza temperaturas e pressões mais baixas se comparado com outras tecnologias, podendo ser realizado em condições ambientais com tempo de reação mais longo. Além disso, quando comparado com pré-tratamentos ácidos, o método álcali causa menor degradação dos açúcares (assim como a ozonólise), é menos corrosivo (promovendo menor deterioração dos reatores) e permite a recuperação ou regeneração dos sais. Em contrapartida, os compostos empregados tem preços mais altos e são utilizados em concentrações maiores, além de estarem relacionado com possíveis problemas ambientais por conta dos resíduos gerados no processo (HAMELINCK et al., 2005).

O aproveitamento biotecnológico da biomassa lignocelulósica, além dos processos de desconstrução e liberação dos derivados, envolve subseqüentes sistemas químicos ou biológicos de transformação desses componentes até a obtenção do produto final com valor agregado. Os processos biológicos envolvendo a bioprodução por cultivo de microrganismos ou uso de suas enzimas, são importantes alternativas pois não carecem de um investimento financeiro alto e têm como resultado, produtos com níveis de pureza passíveis de serem aplicados em diferentes indústrias (LINGER et al., 2014).

O ácido ferúlico é um dos importantes derivados da oxidação da estrutura lignocelulósica (HUNTER et al., 2012). Ele está presente nas paredes celulares de plantas, na forma livre ou ligado covalentemente aos biopolímeros de hemicelulose e lignina. Embora tenham sido reportados diferentes compostos oriundos da biotransformação deste composto por diversos microrganismos, o mais comum é o 4-vinilguaiacol, que corresponde ao primeiro produto a ser gerado por descarboxilação do ácido ferúlico, podendo ser posteriormente convertido a vanilina (MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007), embora tenha sido descrito para alguns microrganismos a vanilina produzida como composto primário da bioconversão (ROZASSA et al., 1995).

A vanilina, nome IUPAC 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde, é o principal componente da baunilha, composto aromático e sávido muito utilizado na culinária. Originalmente é encontrado nas orquídeas do gênero *Vanilla*, hoje cultivadas em países tropicais como o México, Taiti, Indonésia e Madagascar (WALTON; MAYER; NARBAD, 2003). Tanto o composto sintético quanto o natural, apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas tendo, portanto, potencial de aplicação na indústria alimentícia como conservante de alimentos. Essas propriedades estão relacionadas à sua baixa massa molar, característica que compartilha com outros compostos fenólicos (BURRI et al., 1996; FITZGERALD et al., 2003). Além disso, a vanilina sintética é usada como fragrância nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Aproximadamente 50% da produção mundial é usada como intermediário nas indústrias química e farmacêutica para a produção de herbicidas, agentes antiespumante e drogas (HOCKING, 1997).

Hoje, muitos estudos vêm desenvolvendo meios de produção da vanilina através de processos biotecnológicos, utilizando extratos enzimáticos brutos ou enzimas purificadas produzidas principalmente por microrganismos na sua síntese. Num trabalho de 2005, Dausch e Pastore defenderam que, se a molécula é produzida por este meio, ela pode ser considerada um produto natural, visto que é oriunda de fontes renováveis e é resultado de processos biológicos.

O Brasil como maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, de coprodutos lignocelulósicos derivados desta produção, tem grande potencial no desenvolvimento de tecnologias, processos e mecanismos que permitam o aproveitamento deste material transformando-o em produtos de valor agregado.

O presente trabalho visou testar a ozonólise como mecanismo de pré-tratamento do material lignocelulósico de modo a desconstruí-lo e usar seus derivados na produção de vanilina, por meio da biotransformação por microrganismos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Quantificar e avaliar a produção de vanilina por bactérias cultivadas em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar submetidos à ozonólise seguidos por extração hidrotérmica ou hidrólise alcalina.

3.2 Objetivos Específicos

- Promover tratamento com ozonólise em bagaço de cana-de-açúcar;
- Promover extração hidrotérmica e hidrólise alcalina em bagaço de cana-de-açúcar;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos gerados pelos tratamentos;
- Avaliar a tolerância das cepas bacterianas aos compostos gerados pelo tratamento por ozônio;
- Avaliar e quantificar a produção de vanilina pelo cultivo bacteriano em derivados do bagaço de cana-de-açúcar tratado com ozonólise.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas bacterianas (Tabela 1) da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – LBMA do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Tabela 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Código de coleção	Nome científico
TD4.31	<i>Bacillus cereus</i>
TG3.30	<i>Micrococcus luteus</i>

5.2 Meio de cultura

Foi utilizado o meio líquido nutritivo (BERTANI, 1951) composto por glicose a 0,2%, cloreto de sódio a 0,1%, triptona a 1% e extrato de levedura a 0,5%.

5.3 Resíduos lignocelulósicos de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi disponibilizado pela Usina Vale, Onda Verde – SP, e preparado através de uma série de lavagens utilizando água corrente (5 ciclos, onde o bagaço foi lavado por 5 minutos, com pausas de ± 2 minutos entre os ciclos para re-acondicionamento da biomassa), com objetivo de retirar os açúcares provenientes da moagem para retirada do caldo. Em seguida, o bagaço foi seco em estufa com circulação de ar a $40 \pm 2^\circ \text{C}$, por aproximadamente 120 horas até atingir teor de umidade inferior a 5% (m/v). A secagem em temperatura baixa permite que haja a preservação das características e componentes do bagaço de cana-de-açúcar. Posteriormente, foi triturado (triturador TRAPP® 400) e tamisado para a padronização do tamanho das partículas inferior a 2,83 mm de comprimento e superior a 1,41 mm de comprimento e armazenado em temperatura ambiente e livre de umidade para uso posterior.

5.4 Definição das condições adequadas para o cultivo das cepas

5.4.1 Obtenção dos inóculos

Os pré-inóculos foram preparados por suspensão de células bacterianas obtidas na coleção indicada no subitem 4.1. Foram adicionadas ao cultivo nutritivo supracitado no subitem 4.2, e incubadas a 30 °C, a 150 rpm, com densidade ótica analisada em espectrofotômetro (DO 600nm=0,8) conforme padronizado.

5.4.2 Condições utilizadas no cultivo

Os parâmetros utilizados no cultivo das cepas – temperatura e pH – foram baseados nas características já descritas para cada uma das bactérias. A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica de Portugal (ASAE) delimita as temperaturas ótimas de crescimento de *Bacillus cereus* como de 30 a 40 °C e, segundo o Manual de Microbiologia Clínica (2019) as de *Micrococcus luteus* são de 25 a 37 °C. Ademais, *B. cereus* apresenta pH ótimo de 6 e 7 (ASAE) e *M. luteus* entre 7 e 11 (BECKER et al., 2019). Dessa forma, todos os cultivos foram realizados em pH 7, 30 °C para *B. cereus* e 35 °C para *M. luteus*.

5.5 Ozonólise

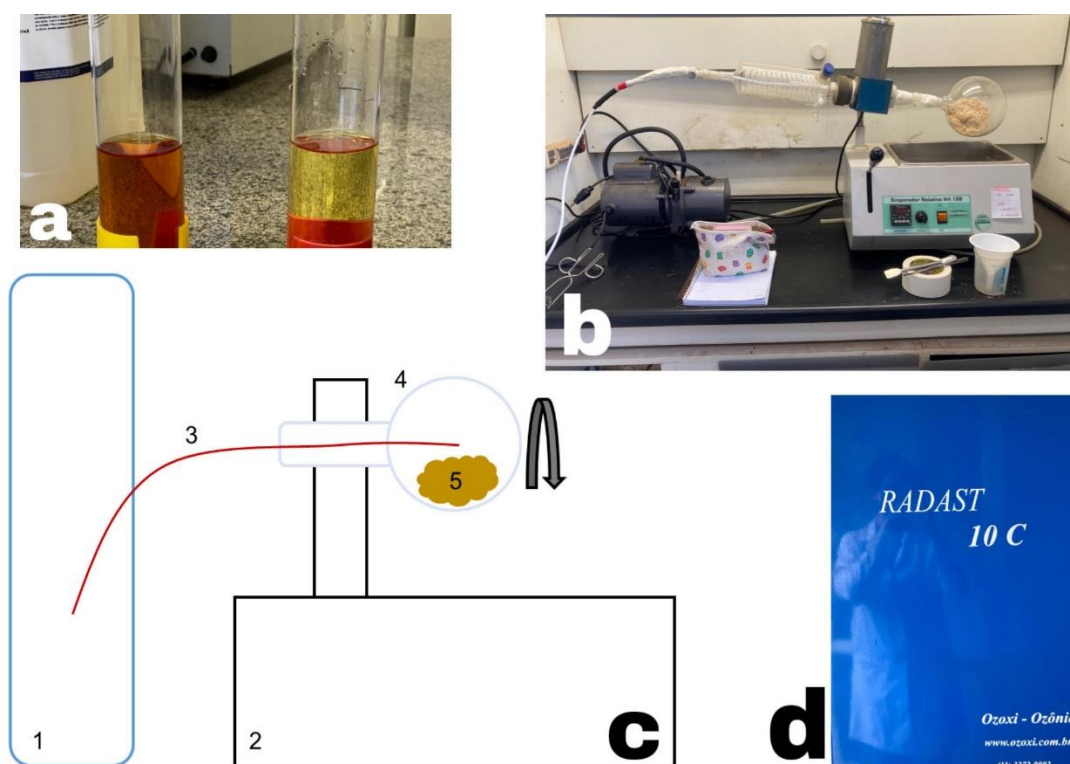
O gás ozônio foi obtido usando o gerador Radast 10C, Ozoxi-Ozônio (Figura 2d) e seu fluxo determinado de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998), passando-se o gás ozônio gerado por 2 dois *Traps* (*Trap A* e *Trap B*) ligados em série, cada *Trap* foi preenchido com 200 mL de solução 2% de Iodeto de Potássio. Após aproximadamente 10 minutos, alíquotas da solução dos *Traps A* e *B* foram retiradas e tituladas com tiosulfato de sódio (0,01 N). O cálculo do fluxo de ozônio foi realizado utilizando a equação 1 e sua concentração foi calculada em 0,624 mg min⁻¹ (Imagem 2a).

Equação 1. Medida da concentração de ozônio.

$$\text{Concentração (mg min}^{-1}\text{)} = \frac{(A+B) \times N \times 24}{T}$$

Sendo: A = volume em mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ titulado no recipiente 1; B = volume em mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ titulado no recipiente 2; N = normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; T = tempo de borbulhamento do gás, em minutos.

Figura 2. (a) Resultado da avaliação da concentração de ozônio. À esquerda o TRAP A (recipiente 1) e a direita o TRAP B (recipiente 2), com suas respectivas diferenças de coloração devido à quantidade de ozônio recebida. (b) Esquema para execução de ozonólise. Pode-se observar a cânula do aparelho de ozonólise ligado ao Evaporador Rotativo 120, que está com seu aquecimento desligado, injetando o ozônio no balão volumétrico contendo bagaço de cana-de-açúcar e rotacionando de forma que a injeção seja uniforme sobre a amostra. (c) Esquema de injeção de ozônio na amostra, sendo: 1- gerador de ozônio, 2- evaporador rotativo, 3- cânula do gerador de ozônio, 4- balão volumétrico e 5- biomassa utilizada. (d) Gerador de ozônio Radast 10C, Ozoxi-Ozônio.



Fonte: Da autora.

A injeção de ozônio nas amostras foi realizada através da sua passagem por um balão volumétrico de 2 L, rotacionando em um Evaporador Rotativo MA 120 com o aquecimento desligado e contendo o bagaço de cana-de-açúcar (Imagem 2b). Cada

uma das amostras continha 20 g de bagaço de cana-de-açúcar. O esquema de injeção (figura 2c) foi realizado nesta formatação para que o ozônio conseguisse atingir toda a amostra de forma igualitária já que, quando realizado em colunas, o contingente da amostra mais próximo ao local da injeção é exposto ao ozônio por maior tempo e numa maior concentração.

Os tempos de ozonólise foram estipuladas em 10 e 30 minutos, de forma que fosse possível avaliar a influência na efetividade do pré-tratamento. Estes períodos de exposição foram escolhidos por já terem sido reportados em diversos trabalhos que utilizaram a ozonólise como pré tratamento na utilização da cana-de-açúcar – Ortega et al., em 2021, utilizou 2, 10, 30 e 60 min e relatou pouca diferença entre os resultados obtidos entre 10 e 60 min. Para cada tempo foram submetidas amostras em duplicatas.

Posteriormente, o bagaço foi armazenado em recipientes livres de umidade e à temperatura ambiente para utilização futura.

5.6 Tratamento alcalino

O tratamento alcalino, ou extração alcalina, foi realizado segundo a metodologia descrita por Zhuang et al., em seu trabalho de 2009, utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5 M como base. Foram selecionadas 5 g de bagaço de cana-de-açúcar de cada uma das amostras tratadas com os diferentes tempos de exposição ao ozônio, que foram colocados em Erlenmeyer de 250 mL juntamente com 95 mL da solução álcali vedados com papel alumínio. Os Erlenmeyer foram levados a autoclave sob temperatura de 120°C por 1 hora, a 1 atm. Em seguida, os frascos foram levados a banho em água gelada e, posteriormente, mantidos em temperatura ambiente para estabilização. O material foi filtrado, o líquido armazenado para análises subsequentes e a fase sólida descartada.

5.7 Tratamento hidrotérmico

O tratamento hidrotérmico, ou extração hidrotérmica, foi realizado em autoclave a 120 °C por 1 hora, a 1 atm. Foram adicionados 5 g de cada amostra tratada com os diferentes tempos de exposição ao ozônio em Erlenmeyer de 250 mL contendo 95 mL de água ultrapura vedados com papel alumínio. Posteriormente, os frascos foram

levados a banho em água gelada e, em seguida, mantidos a temperatura ambiente para estabilização. O material foi filtrado, o líquido armazenado para análises subsequentes e a fase sólida descartada.

5.8 Ensaio para avaliação da tolerância das cepas aos compostos derivados da ozonólise do bagaço da cana-de-açúcar

Em Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio líquido nutritivo (BERTANI, 1951), os pré-inóculos foram incubados a 30 °C (*B. cereus*) e 35 °C (*M. luteus*) e agitação de 150 rpm. O acompanhamento do crescimento foi feito pelo aumento na absorbância (DO 600nm). Quando as culturas atingiram DO 600nm = 2,0, alíquotas de 10 µL foram utilizadas para inocular Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio líquido nutritivo ao qual foram adicionados 10 ou 50% dos compostos derivados da ozonólise seguida por tratamento hidrotérmico ou da ozonólise seguida por tratamento hidrotérmico alcalino, em triplicatas. A cultura foi incubada a 30 °C (*B. cereus*) e 35 °C (*M. luteus*), sob agitação de 150 rpm durante 10 horas. A cada 2 horas, em câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas de 200 µL para determinação do crescimento em absorbância (DO 600nm). Foram realizados controles sem a adição dos compostos derivados (controle biótico) e controles com os derivados, porém não inoculados com os microrganismos (controle abiótico), assim como o meio de cultura sem adição dos compostos e microrganismos foi utilizado como branco.

5.9 Cultivo para avaliação da produção de vanilina nos compostos provenientes da ozonólise

O mesmo pré-inóculo preparado do item anterior foi utilizado na inoculação das amostras do cultivo para avaliação da produção dos compostos de interesse. A quantidade utilizada do pré-inóculo foi de 10 µL para cada uma das unidades experimentais.

O cultivo foi realizado em triplicatas, em Erlenmeyer de 50 mL, contendo 15 mL do meio líquido nutritivo (BERTANI, 1951) e 10 ou 50% de concentração dos compostos derivados do bagaço de cana-de-açúcar tratado com ozonólise por 10 minutos. As culturas inoculadas com *B. cereus* foram incubadas à 30 °C e as inoculadas com *M. luteus* à 35 °C, ambas em agitador rotativo a 150 rpm, durante 10

horas. Foram realizados controles sem adição dos compostos derivados (controle biótico) e controles com os compostos, porém não inoculados com os microrganismos (controle abiótico).

A cada 2 horas, em uma câmara de fluxo, foram extraídas alíquotas de 200 µL, as quais foram utilizadas para determinação do crescimento por absorbância a 600nm, e alíquotas de 2 mL, utilizadas para aferição das alterações de pH e para preparação das amostras analisadas por métodos cromatográficos. A quantificação da produção de cada um dos compostos, assim como a bioconversão do ácido ferúlico (%), foram calculados.

5.10 Métodos analíticos

5.10.1 Padrões analíticos

Foram escolhidos para análise neste trabalho uma série de compostos relacionados às biotransformações do ácido ferúlico, composto produzido a partir dos pré tratamentos utilizados no bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 2).

Tabela 2. Nomenclatura neste trabalho, nomes IUPAC e massas molares dos compostos analisados.

Nomenclatura neste trabalho	Nome IUPAC	Massa molar (g/mol)
Ácido ferúlico	4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid	194,18
Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-Hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	164
Ácido gálico	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	170,12
Ácido vanílico	4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	168,15
Vanilina	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	152,15
Acetovanilona	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone	166,17

Descrito como portador de propriedades antioxidantes (CAROCHO & FERREIRA, 2013; HELENO et al., 2015), antimicrobianas (HELENO et al., 2015; TAOFIQ et al., 2017), anti-inflamatórias e como inibidor da tirosinase e colagenase (TAOFIQ et al., 2017; TAOFIQ et al., 2016), o ácido p-cumárico é bastante visado pela indústria de *skincare* e é encontrado em algumas estruturas da cana-de-açúcar, como

o bagaço. O ácido vanílico, por sua vez, é largamente utilizado nas indústrias alimentícia e química como aromatizante, porém mais recentemente têm ganhado também espaço na indústria farmacêutica por conta de seu provável papel como agente neuroprotetivo (SHARMA et al., 2020).

Além deles, foram selecionados também outros dois compostos para análise: ácido gálico (IUPAC 3,4,5-trihydroxybenzoic acid), pois se também se trata de um composto fenólico procurado pela indústria cosmética por possuir propriedades antioxidantes, antimicrobianas, auxiliar na síntese de colágeno e ser um inibidor de colagenase e elastase (CAROCHO & FERREIRA, 2013; GUIL-GUERRERO et al., 2016; TAOFIQ et al., 2016; DZIALO et al., 2016) presente no bagaço da cana-de-açúcar; e acetovanilona (IUPAC 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone), composto muitas vezes considerado uma impureza na síntese de vanilina derivada da lignina, mas que, por outro lado, também funciona como um acentuador de sabor, fazendo com que a vanilina obtida por este meio apresente odor e sabor mais ricos do que aquela proveniente de óleos, como o guaiacol vindo da indústria petroquímica (ESPOSITO, 1997).

5.10.2 Preparação das amostras para análise cromatográfica

Cada uma das amostras que serão analisadas foi submetida a ajuste do pH com solução de HCl à 0,1 e/ou 2 N, a depender do tamanho da correção necessária, até atingir pH 2,5. Este valor é relatado como o limite em que acontece precipitação de lignina presente no meio, portanto, ao regular o pH anteriormente à injeção no cromatógrafo é impedida a ocorrência do evento no interior da coluna cromatográfica e preservada a integridade da mesma.

Após a formação do precipitado, as amostras foram centrifugadas a 14000 × g por 15 minutos à 4 °C e filtradas em membrana 0,2 µm.

5.10.3 Análise cromatográfica

Para acompanhar as variações da concentração do ácido ferúlico, bem como dos demais compostos, foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 1260 Infinity acoplado a um detector de arranjo de diodos (*diode array detector* - DAD) e Espectrômetro de Massas Quadrupole-Time Of Flight (Q-TOF) 6545

(Agilent, Waldbronn, Alemanha), localizado no Departamento de Química Analítica e Tecnologia de Alimentos da Universidad de Castilla La-Mancha, Ciudad Real – Espanha (Figura 3). O *software* de controle foi o Masshunter Workstation versão B.06.11 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). O Q-TOF utilizou uma fonte Dual Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJS-ESI) operada no modo de ionização negativa e os seguintes parâmetros foram definidos: tensão capilar, 3500 V; fragmentador, 150; temperatura do gás, 300°C; gás de secagem, 11 L/min⁻¹; nebulizador, 20 psig; temperatura do SheathGas, 350°C; fluxo do SheathGas, 11 L/min⁻¹; e faixa de aquisição, 100–1200 m/z. As amostras foram analisadas após a injeção (30 µL) em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD (2,1 mm × 50 mm, 1,8 µm) protegida com uma coluna de guarda de 5 mm do mesmo material termostaticada a 40 °C, onde o fluxo foi determinado à 300 µL/min⁻¹. Os solventes utilizados foram: Solvente “A” 5 mM de formato de amônio + 0,1% de ácido fórmico em água e Solvente “B” 5 mM de formato de amônio + 0,1% de ácido fórmico em metanol. O gradiente de eluição foi (tempo, % de Solvente “B”): 2 min, 7%; 25 min, 32%; 40 min, 57%; 50 min, 67%; 55 min, 97%; 65 min, 97%; 70 min, 7%; além disso, foi programado um *post time* de 8 minutos. O tempo de análise para cada amostra foi de 70 minutos no total.

Figura 3. Sistema HPLC-DAD-Q-ToF Dual AJS-ESI.



Fonte: Dr. José Pérez Navarro.

A determinação do tempo de retenção de cada um dos compostos analisados foi feita em concentrações distintas e personalizadas de acordo com o comportamento

das substâncias – aquelas que apresentaram picos muito pequenos tiveram suas concentrações aumentadas, enquanto as que apresentaram saturação dos picos tiveram a concentração diminuída. Com os dados das áreas dos picos dos compostos em cada uma das concentrações utilizadas foram plotadas os gráficos e curvas de calibração para averiguação da efetividade do método utilizado na quantificação das substâncias, através da curva de calibração foi calculado o R^2 de cada analito (Tabela 3).

Tabela 3. Compostos analisados e suas respectivas concentrações, tempos de retenção e R^2 .

Composto	Concentrações (mg/L)	Tempo de retenção (min)	R^2
Ácido ferúlico	1, 5, 10, 25 e 30	41 - 43	0,9989
Ácido p-cumárico	1, 5, 15 e 20	5 e 41	0,9895
Ácido vanílico	1, 5, 10, 40 e 60	34	0,9897
Ácido gálico	0,0005, 0,001, 0,1, 1 e 10	15	0,9989
Acetovanilona	5, 10, 20, 40 e 60	5 e 39	0,9929
Vanilina	1, 5, 10, 40 e 60	36	0,9931

Cada uma das amostras foi injetada em duplicata e analisada individualmente para cada um dos compostos alvo de acordo com a massa molecular e/ou fórmula, através da ferramenta *Find Formula* presente no *software*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

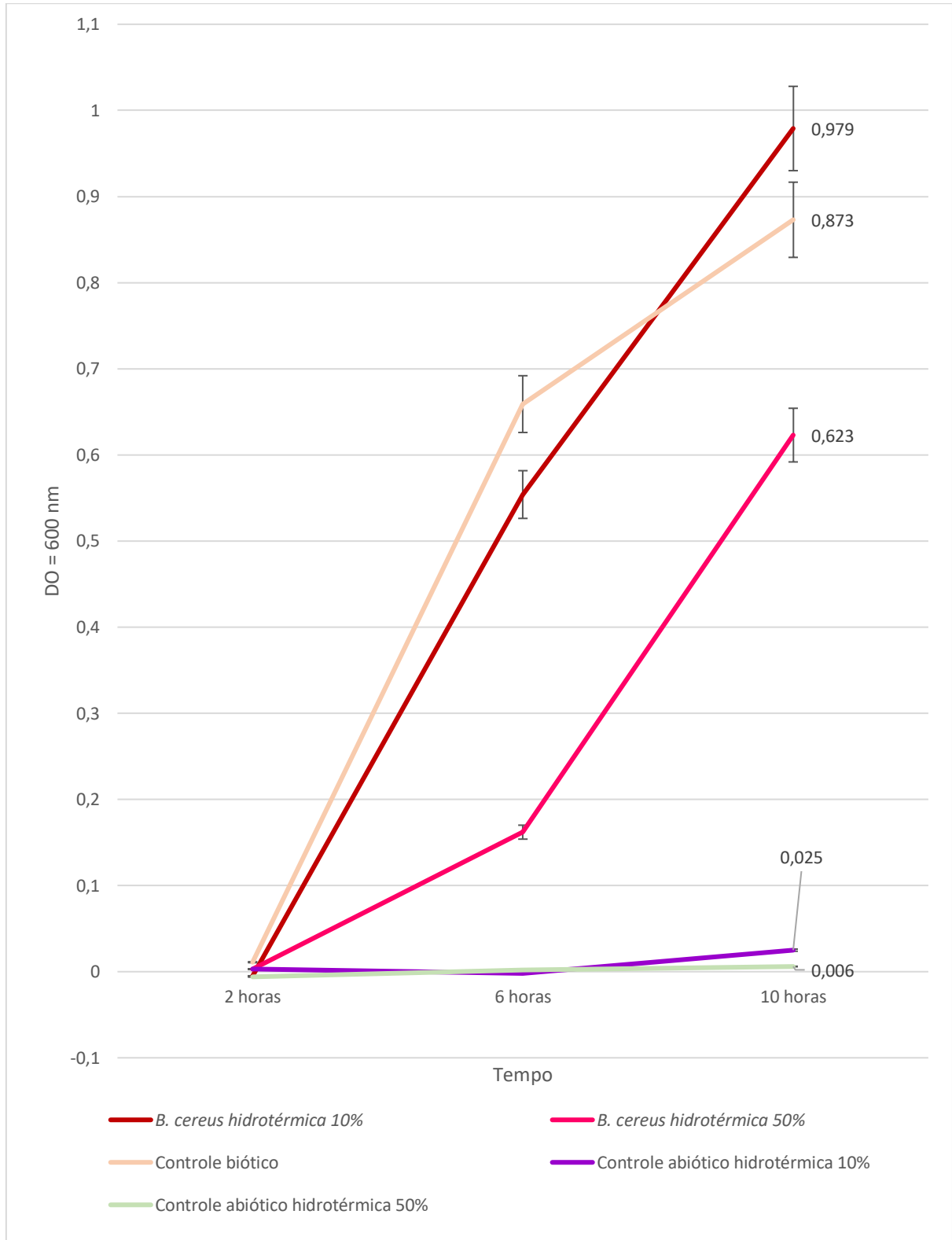
6.1 Avaliação de tolerância aos compostos derivados dos pré-tratamentos

Como podemos observar nas figuras 3, 4, 5 e 6, os microrganismos foram capazes de se multiplicar independentemente do tipo de extrato adicionado ao meio, havendo variações da absorvância de acordo com o microrganismo, extrato utilizado e porcentagem adicionada.

Na Figura 4, onde está representado o gráfico do cultivo de *Bacillus cereus* em meios contendo os compostos derivados de cana-de-açúcar tratada com ozonólise por 10 minutos seguida pela extração hidrotérmica em concentrações de 10 ou 50%, podemos observar que o crescimento exponencial do cultivo com concentração de 10% se manteve durante todo o período analisado, havendo uma pequena desaceleração a partir das 6 horas. O controle biótico apresentou fase log acentuada entre as análises de 2 e 6 horas, porém a partir das desta última o crescimento teve velocidade diminuída indicando o início de uma fase estacionária. Enquanto isso, no cultivo com concentração de 50% é possível verificar um crescimento mais lento entre os dois primeiros tempos, demonstrando uma possível fase lag mais longa que dos cultivos anteriores, demonstrando uma possível conversão pelas bactérias de substâncias presentes no meio em quantidades elevadas e que poderiam ser prejudiciais ao microrganismo, entretanto, a partir das 6 horas a fase log foi proeminente. Na última análise, o cultivo com 10% apresentou absorvância 12,14% maior que o controle biótico, ao passo que o cultivo com 50% teve 40,12% menor que o mesmo.

No cultivo de *B. cereus* em meios contendo compostos derivados de cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise por 10 minutos e seguida por extração alcalina (Figura 5), verificamos que entre os períodos de 2 a 6 horas o cultivo com 10% do extrato apresentou fase de latência, o que indica um provável mecanismo de desintoxicação do meio pelas bactérias. A partir de 6h de tempo foi possível observar um crescimento exponencial do cultivo que atingiu, em sua última amostragem, absorvância 61,39% menor que o controle biótico. O ensaio realizado com o extrato na concentração de 50%, por sua vez, tem gráfico que demonstra fase de latência com ligeiro crescimento durante todo o período de análise, o que corrobora a possibilidade de que este tipo de extração gera compostos menos tolerados pelas bactérias e que elas necessitam passar por um tempo de adaptação/transformação destes compostos antes de iniciar o crescimento exponencial. Entretanto, mesmo com o crescimento pequeno ele ainda é detectado, podendo ser observado no último tempo de análise quando a absorvância do cultivo é 12,76% maior que seu respectivo controle abiótico.

Figura 4. Cultivo de *B. cereus* em meios contendo compostos derivados de cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise por 10 minutos seguida por extração hidrotérmica em concentrações de 10 ou 50%.



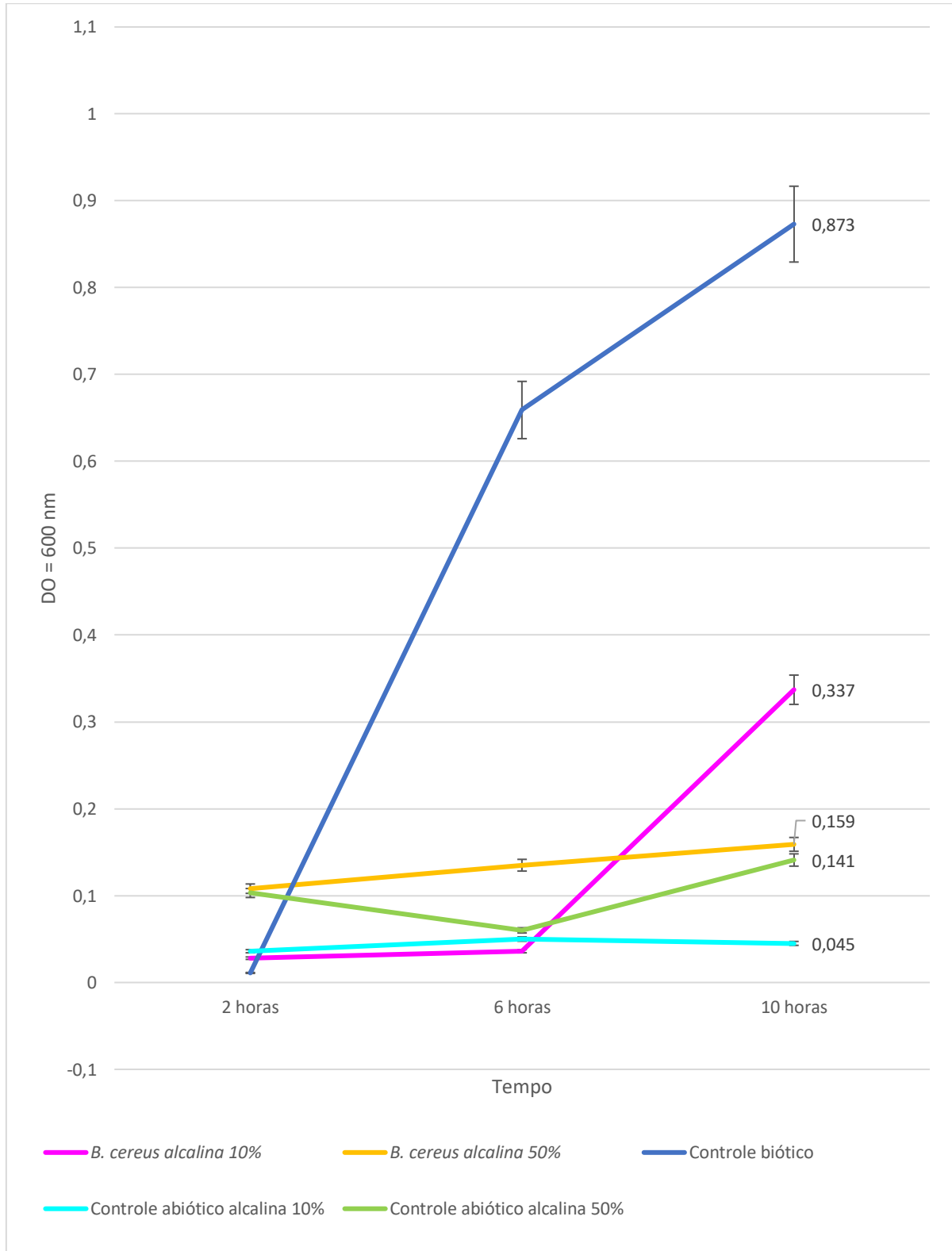
Fonte: Da autora.

Na Figura 6, que representa os gráficos de crescimento dos cultivos realizados com *Micrococcus luteus* e extratos de cana-de-açúcar tratada com ozonólise por 10 minutos e extraídas pelo método hidrotérmico, o ensaio com 10% de concentração do extrato apresentou crescimento exponencial acentuado entre 2 e 6 horas, tendo tido uma leve desaceleração à partir deste período até as 10 horas, quando foi feita a última análise e constatada uma absorvância 14,12% maior do que aquela reportada para o controle biótico. Em respeito ao cultivo realizado com 50% de concentração do extrato, vemos que a fase log é detectada em todo o período analisado, sendo que entre os tempos de 2 e 6 horas o crescimento é mais acelerado que no momento seguinte, onde podemos observar um amortecimento da reprodução bacteriana podendo indicar a proximidade da fase estacionária. A absorvância deste ensaio foi 35,62% menos que do controle biótico.

No que tange os cultivos realizados com *M. luteus* e extratos de cana-de-açúcar tratada com ozonólise seguida por extração alcalina (Figura 7), constatamos uma fase lag entre as 2 e 6 horas no cultivo com 10% do extrato, inclusive havendo decréscimo de 22% entre os valores de absorvância observados na alíquota retirada na primeira e na segunda análises. Entretanto, no período entre as 6 e 10 horas, ocorreu o início da fase log, finalizando com absorvância 17% menor que o controle biótico, mas 213,33% maior que o controle abiótico respectivo. Por sua vez, o cultivo realizado com extrato à uma concentração de 50% apresentou o mesmo padrão no gráfico de crescimento, porém na fase de latência não houve decréscimo da absorvância. Este ensaio teve absorvância verificada na última alíquota de 57,44% maior que o controle abiótico correspondente.

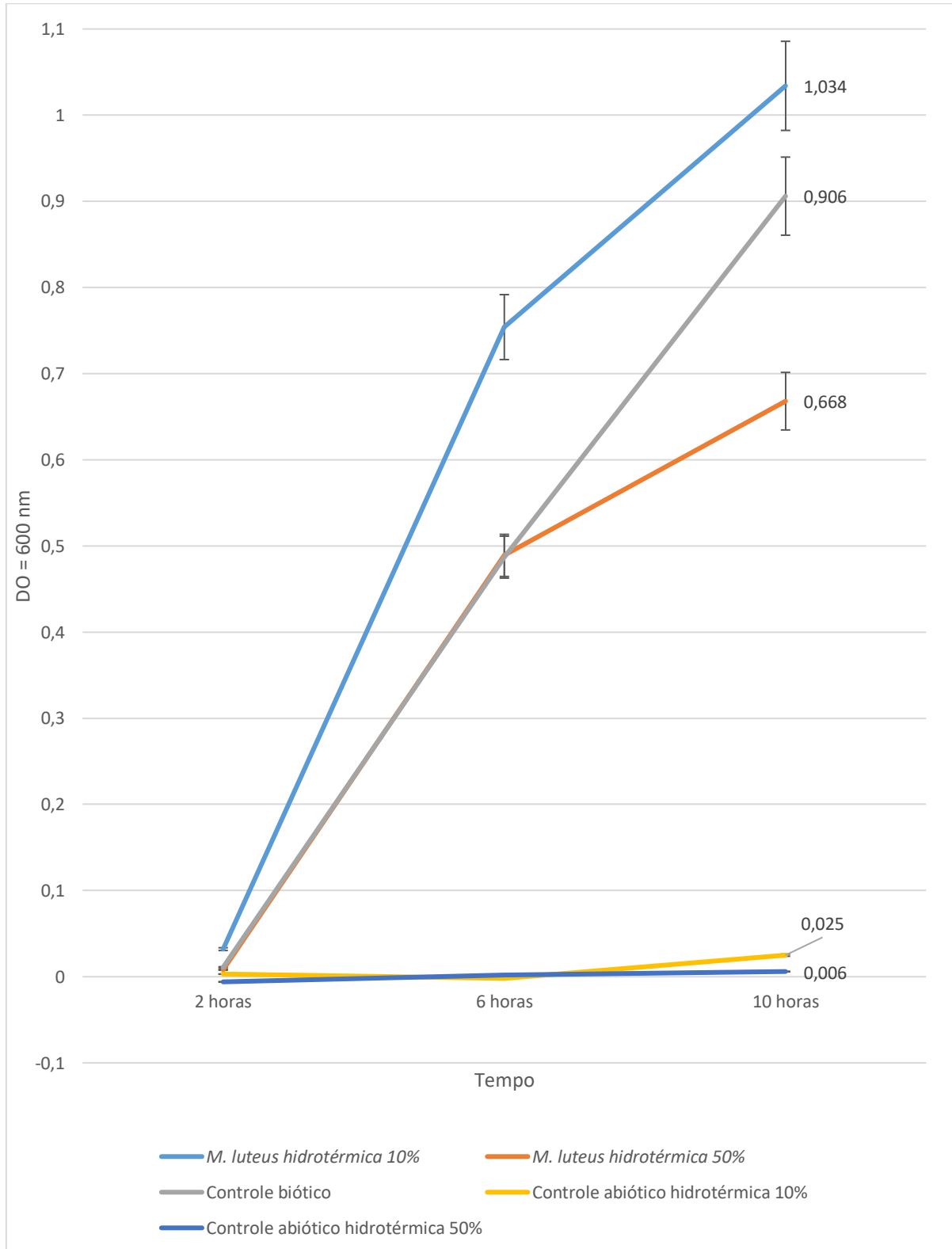
Em todos os cultivos realizados com licores advindos das extrações hidrotérmicas obteve-se crescimento maior dos microrganismos empregados, demonstrando uma maior facilidade dessas bactérias de sobreviverem neste meio. Este tipo de ambiente é positivo quando se trata da produção dos microrganismos em si, porém quando o objetivo são os produtos do metabolismo bacteriano principalmente em fase de adaptação – o que ocorre normalmente na fase lag – muitas vezes é mais interessante os meios que provocam uma maior necessidade da bactéria de alterá-lo, dessa forma transformando alguns compostos presentes no ambiente em outros mais tolerados por elas. Este tipo de comportamento dos microrganismos é visto nos meios onde foram adicionados licor gerado através de extração alcalina.

Figura 5. Cultivo de *B. cereus* em meios contendo compostos derivados de cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise por 10 minutos seguida por extração alcalina em concentrações de 10 ou 50%.



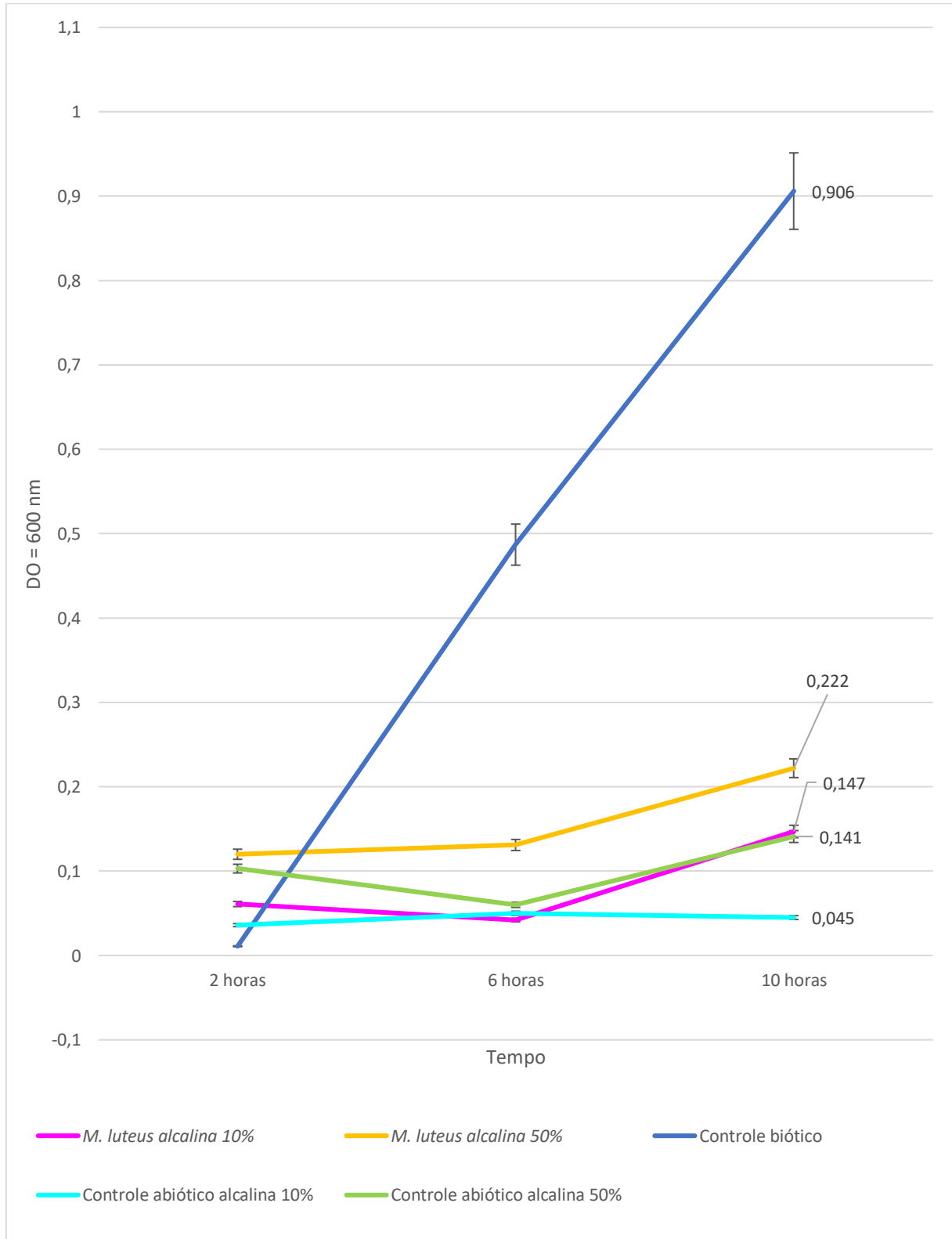
Fonte: Da autora.

Figura 6. cultivo de *M. luteus* em meios contendo compostos derivados de cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise por 10 minutos seguida por extração hidrotérmica em concentrações de 10 ou 50%.



Fonte: Da autora.

Figura 7. Cultivo de *M. luteus* em meios contendo compostos derivados da cana-de-açúcar pré tratada com ozonólise seguida por extração alcalina em concentrações de 10 ou 50%.



Fonte: Da autora.

6.2 Análises cromatográficas

6.2.1 Extratos

Foram analisados, através da metodologia descrita no item 5.10.3, os extratos de cana-de-açúcar tratados com ozonólise por 10 e 30 minutos seguidos por extração hidrotérmica ou alcalina, bem como os cultivados de *B. cereus* e *M. luteus* em meios contendo 10 e 50% dos extratos advindos da ozonólise por 10 minutos. Reunindo as informações geradas pelo *software* Mass Hunter Workstation, foram calculadas as quantidades presentes dos compostos de interesse em cada uma das amostras.

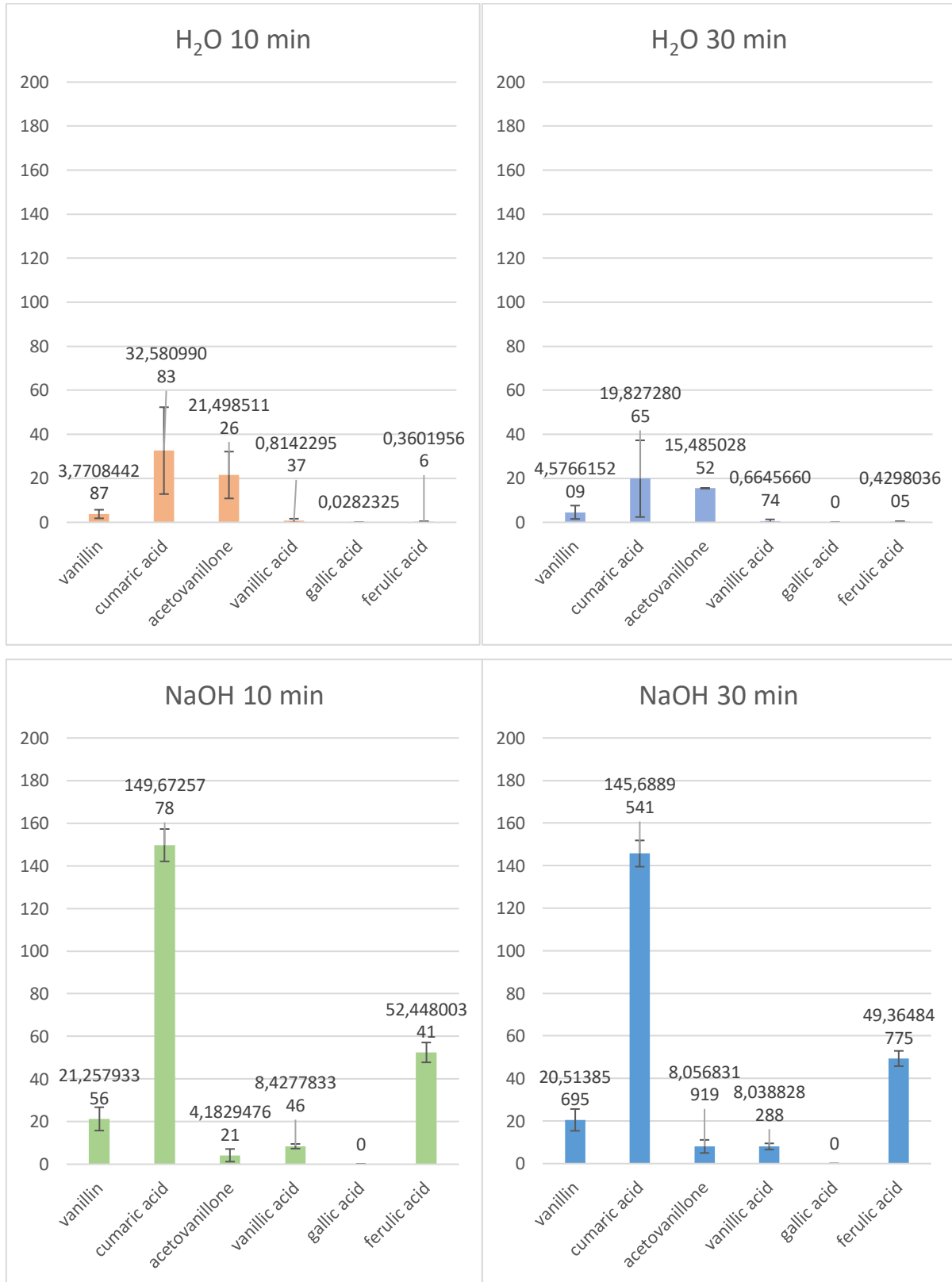
Nos gráficos de quantificação dos extratos (Figura 8), verificou-se uma concentração mais elevada da maioria dos compostos naqueles extraídos por meio do processo alcalino, exceto acetovanilona – que apresentou uma média de 21,5 e 15,5 mg/L nos extratos hidrotérmicos e de 4 e 8 mg/L nos extratos alcalinos. Ácido *p*-cumárico apresentou concentração 78% maior em licor de ozonólise por 10 minutos seguido por extração alcalina do que no licor submetido ao tratamento com ozônio pelo mesmo tempo e extraído hidrotérmicamente. Já nos tratamentos equivalentes, porém com ozonólise por 30 minutos, a quantidade do composto seguiu padrão semelhante, sendo 86% maior no método alcalino que no hidrotérmico, demonstrando que o tempo de tratamento maior que 10 minutos não promoveu maior hidrólise do material.

Outro composto com grande variação entre os tratamentos foi o ácido ferúlico. Nas extrações hidrotérmicas sua concentração foi baixa, em média 0,36 e 0,42 mg/L em 10 e 30 minutos de ozonólise respectivamente, enquanto nas extrações alcalinas foram registrados valores por volta de 115x maiores, 52 e 49 mg/L em 10 e 30 min de exposição ao ozônio.

A vanilina foi quantificada já nos extratos, tanto hidrotérmicos quanto alcalinos, em concentrações variando entre ± 4 mg/L (extração hidrotérmica) e ± 20 mg/L (extração alcalina).

Em conclusão, o tratamento alcalino libera maior quantidade dos compostos estudados, enquanto que não se observou diferenças entre tempos de tratamento prévio do bagaço por ozonólise de 10 e 30 min.

Figura 8. Quantificação dos compostos nos extratos de bagaço de cana de açúcar tratados com ozonólise por 10 ou 30 minutos e extraídos com água ou NaOH. Valores expressados em mg/L.



Fonte: Da autora.

6.2.2. Cultivos dos microrganismos em hidrolisados hidrotérmico e alcalino de bagaço submetido a ozonólise

Na figura 9 está a visão geral da concentração de compostos (mg/L) para culturas de *Micrococcus luteus* cultivadas com licores extraídos com H₂O e anteriormente submetidos a ozonólise por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou 50% de concentração do licor.

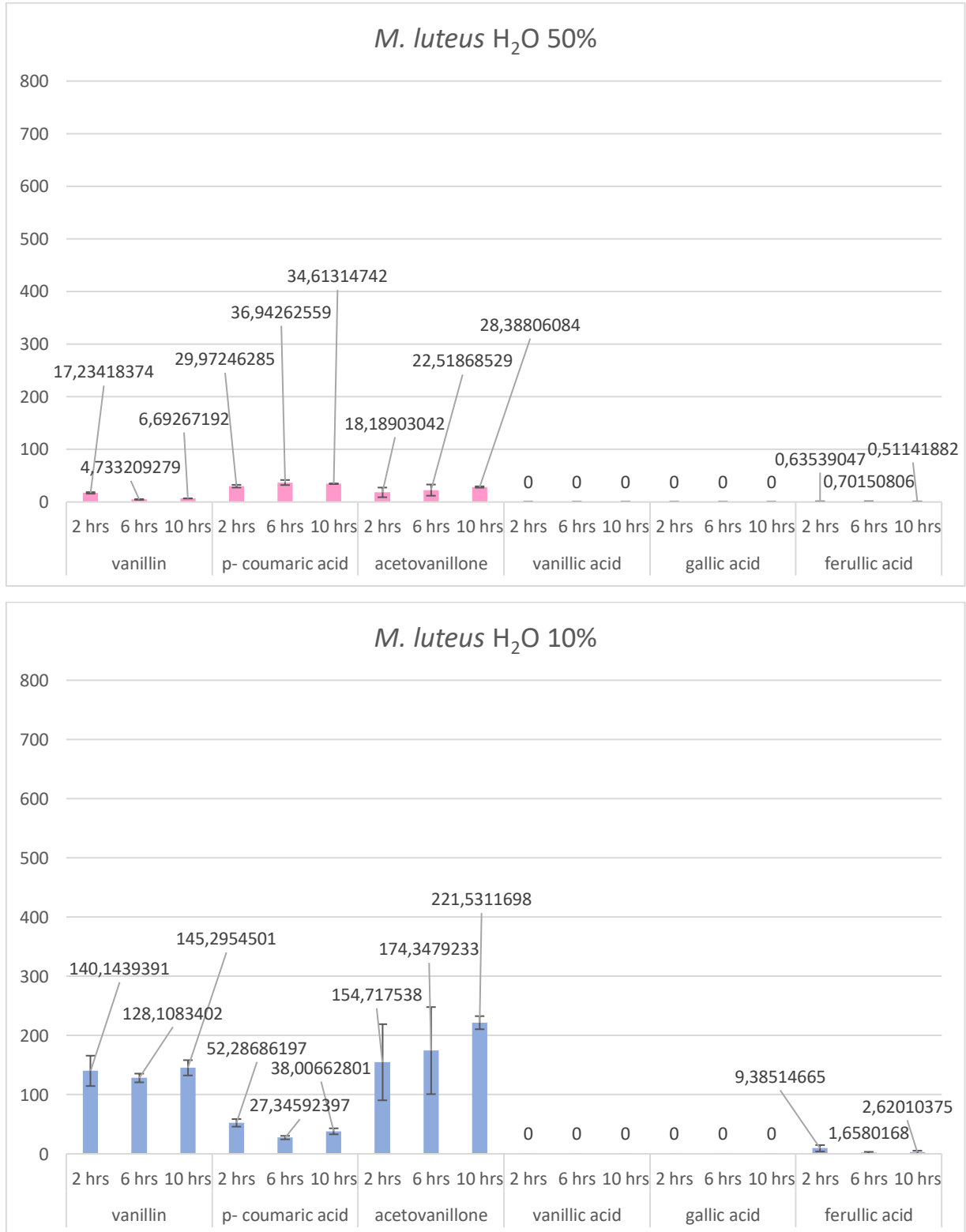
Os compostos ácidos vanílico e gálico não foram detectados nas amostras de nenhum dos pontos analisados, enquanto os demais tiveram suas concentrações mais elevadas nos cultivos onde foram adicionados apenas 10% do licor.

No cultivo com 50% dos compostos observamos uma concentração quase decrescente de vanilina, onde na primeira amostra (2 horas) temos 17,2 mg/L e nas seguintes (6 e 10 horas de cultivo) 4,7 e 6,6 mg/L, respectivamente. Esse dado levanta a hipótese de que a vanilina esteja sendo convertida a algum outro composto ou sendo consumida pela bactéria no decorrer do tempo de cultivo. Entrementes, as concentrações de ácido p-cumárico e acetovanilona tiveram comportamentos diferentes. O primeiro registrou maior quantidade na análise de 6 horas (36,9 mg/L), na de 2 hrs 29,9 mg/L e na de 10 hrs 34,6 mg/L, este padrão de concentração é exatamente o contrário do verificado para vanilina podendo indicar uma interação entre os dois compostos. Dixon (2010) descreve a síntese de vanilina através de alguns métodos (Figura 10), incluindo o que parte da molécula de ácido cumárico por meio de encurtamento não oxidativo da cadeia. Dessa forma podemos supor que há uma correlação entre estes valores, pois quando a concentração de um composto aumenta, a do outro diminui.

A acetovanilona, por sua vez, teve concentração crescente ao longo do tempo de avaliação. A substância iniciou a amostragem com 18,1 mg/L (2 hrs), passando para 22,5 mg/L (6 hrs) e, por fim, 28,3 mg/L (10 hrs).

Finalizando os compostos deste cultivo, o ácido ferúlico teve sua concentração calculada em média de 0,5 mg/L, não tendo alterações significativas ($\pm 0,1$ mg/L) durante o tempo de cultivo.

Figura 9. Visão geral da concentração de compostos para culturas de *M. luteus* com licores extraídos hidrotermicamente de bagaço submetido a ozonólise por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou 50% de concentração do licor. Valores expressos em mg/L.



Fonte: Da autora.

No cultivo onde foram adicionados 10% do extrato de cana-de-açúcar submetida a ozonólise por 10 minutos e seguida por extração hidrotérmica (Figura 8), verificamos algumas diferenças e semelhanças nos padrões de comportamento dos compostos. Assim como na análise anterior, os ácidos vanílico e gálico não foram quantificadas, tendo picos não significativos na cromatografia e espectrometria de massas.

Os níveis de ácido p-cumárico ficaram abaixo dos de vanilina e acetovanilona, ao contrário do cultivo de 50% onde este composto foi o de maior concentração. Neste ele apresentou o mesmo padrão, tendo 52,2 mg/L na primeira amostragem (2 h), depois caído para 27,3 mg/L na segunda (6 h) e, posteriormente, voltado a crescer na última (10 h) com 38 mg/L registrado. Vanilina teve registrada uma concentração mais alta que o cultivo anterior, variando entre 140,1 mg/L (2 h), passando por 128,1 mg/L (6 h), e 145,2 mg/L (10 h). Ao contrário do verificado no ensaio com 50%, a vanilina e o ácido p-cumárico tiveram o mesmo padrão de concentração, começando a análise com um valor, diminuindo no meio do tempo e voltando a aumentar na última amostra observada. Neste caso, a hipótese é de que a via de formação da vanilina não parte do ácido p-cumárico, mas sim de ácido ferúlico, que apresenta concentração de 9,3 mg/L na primeira análise (2 h) e cai consideravelmente nas duas próximas – para 1,6 e 2,6 mg/L, respectivamente. Como já exposto na revisão bibliográfica deste trabalho, a vanilina pode ser o primeiro composto a ser produzido pela descarboxilação do ácido ferúlico por meio do metabolismo bacteriano, o que explicaria, portanto, a diminuição da concentração deste composto em virtude do aumento da concentração da vanilina.

A acetovanilona foi o composto de maior concentração registrado neste cultivo, em todas as mostras analisadas. Na primeira hora (2 h) tivemos 154,7 mg/L, na segunda (6 h) 174,3 mg/L e na terceira (10 h) 221,5 mg/L, mantendo o crescimento crescente registrado no cultivo discutido anteriormente.

Na figura 11 estão expostos os gráficos da visão geral da concentração dos compostos em cultivos de *Bacillus cereus* com licores extraídos hidrotérmicamente de cana-de-açúcar submetida a ozonólise por 10 minutos. Os ensaios apresentavam 10 ou 50% dos licores.

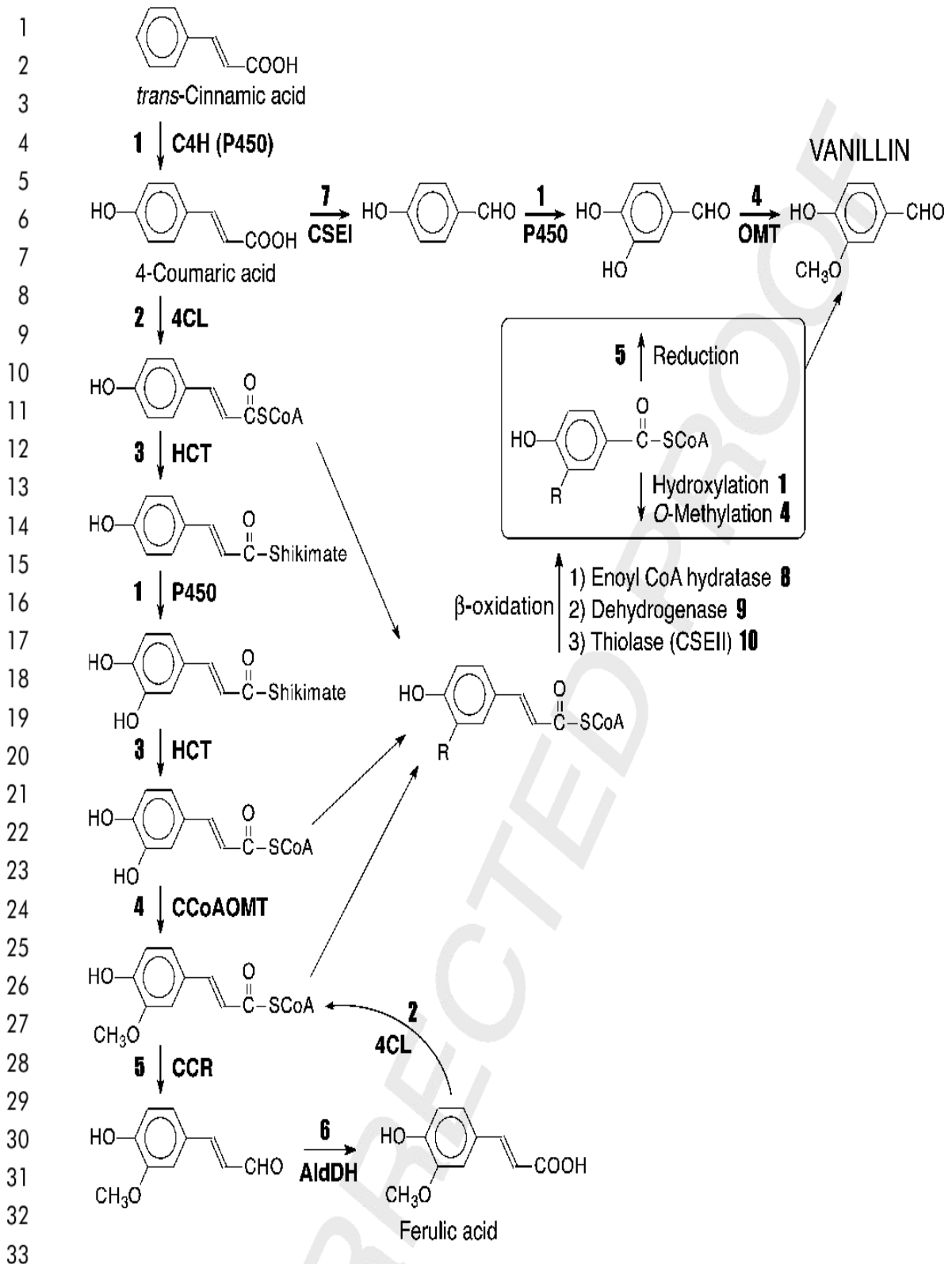
No cultivo com 50% do extrato, tanto ácido vanílico quanto ácido gálico foram quantificados apenas na análise de 2 horas, tendo sido registrados valores baixos – de 0,5 e 0,04 mg/L respectivamente.

A vanilina, ao contrário do que foi observado nos ensaios com *M. luteus*, teve a maior concentração na segunda análise, partindo de 8,1 mg/L (2 h) para 15 mg/L (6 h) e 1,4 mg/L (10 h). Ácido p-cumárico, por sua vez, teve concentração crescente durante todo o tempo de análise, tendo sido verificada 31,6 mg/L na primeira amostra, 35,9 mg/L na segunda e 36,1 mg/L na terceira, além disso, este composto foi o de maior concentração no cultivo. A acetovanilona, assim como a substância anterior, teve crescimento crescente, apresentando 14,3 mg/L às 2 horas, 18,5 mg/L às 6 horas e 29 mg/L às 10 horas. Finalmente, o ácido ferúlico também registrou o mesmo comportamento, tendo registrado $\pm 0,4$ mg/L nas duas primeiras análises e 1 mg/L na última.

Já no ensaio contendo 10% do extrato, mais uma vez foram registrados valores mais altos na concentração dos compostos em comparação ao cultivo com 50%. Vanilina teve crescimento parecido, com a maior concentração no tempo do meio da análise. Às duas horas foram registrados 77,4 mg/L, às 6 horas 95,1 mg/L e às 10 horas 45,1 mg/L. De forma contrária, para ácido p-cumárico o tempo com menor concentração foi o de 4 horas, com 28,8 mg/L. Nos tempos de 2 e 10 horas o composto teve 34,1 e 37,5 mg/L, respectivamente. Assim como no cultivo anterior, acetovanilona apresentou padrão de crescimento crescente durante o ensaio, com uma elevação considerável (5 vezes) entre os tempos de 6 e 10 horas. Na primeira amostragem a concentração foi de 116,1 mg/L, na segunda de 126,8 mg/L e na terceira de 638,5 mg/L.

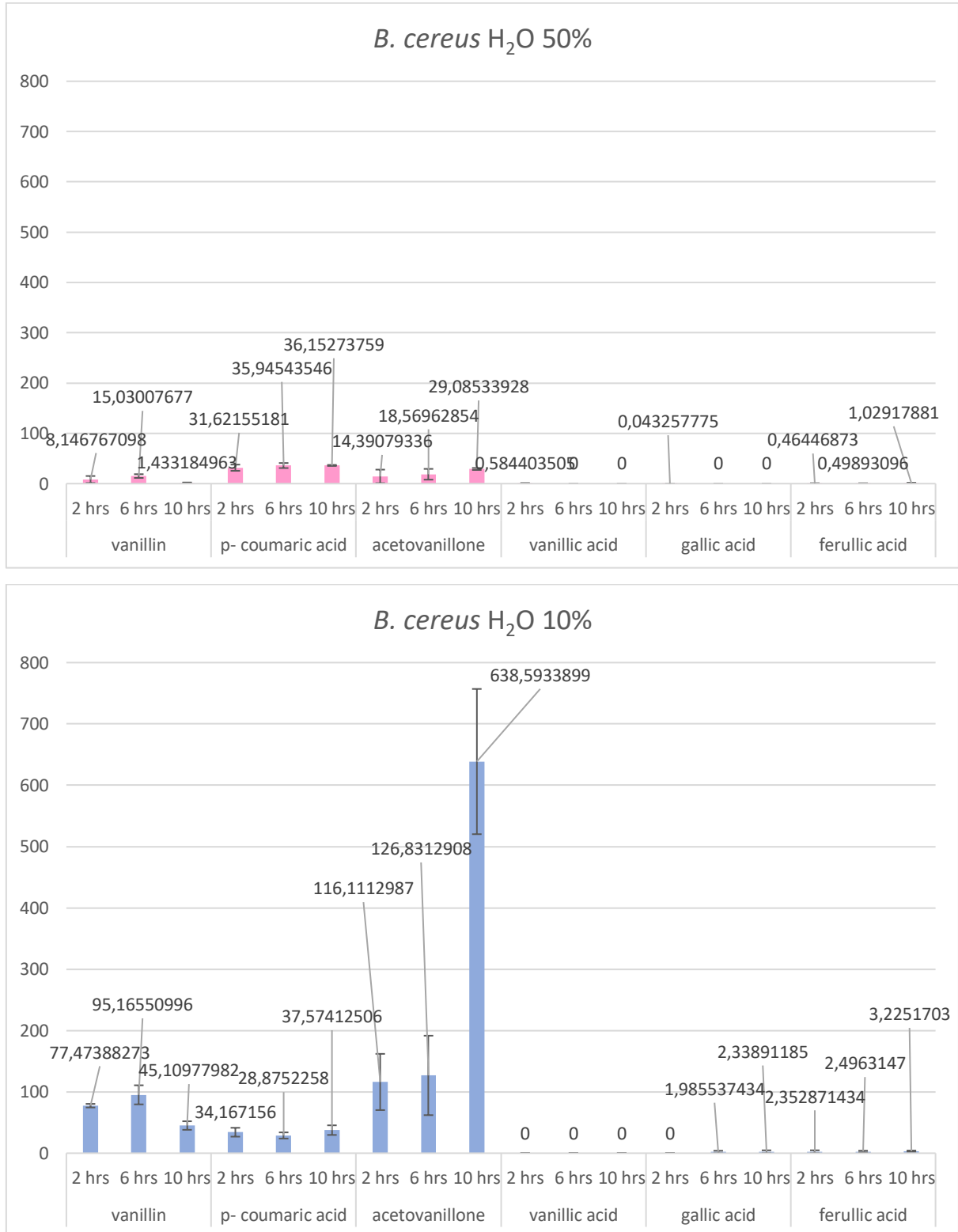
Ácido vanílico não teve registro em nenhuma das amostras analisadas, enquanto ácido gálico teve somente nas duas últimas, tendo 1,9 e 2,3 mg/L às 6 e 10 horas, nesta ordem. Entrementes, ácido ferúlico também teve concentrações consideradas baixas, porém crescentes durante o cultivo: 2,3 mg/L 2 horas, 2,4 mg/L 6 horas e 3,2 mg/L 10 horas.

Figura 10. Esquema da produção de vanilina através de diferentes rotas. A vanilina é mostrada originando-se de duas rotas mecanicamente diferentes: diretamente do ácido cumárico por encurtamento não oxidativo da cadeia, ou através de qualquer um dos três ésteres de coenzima A por β -oxidação.



Fonte: Retirado do artigo "Vanillin Biosynthesis – Not as simple as it seems?" de Richard A. Dixon.

Figura 11. Visão geral da concentração de compostos para culturas de *B. cereus* com licores extraídos hidrotérmicamente e submetidos a ozonólise por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou 50% de concentração do licor. Valores expressos em mg/L.



Fonte: Da autora.

A visão geral da concentração de compostos para cada uma das culturas de *Micrococcus luteus* cultivadas com licores extraídos com NaOH e submetidos a ozonólise por 10 minutos estão expostas nos gráficos contidos na Figura 12. Os ensaios apresentavam 10% ou 50% de concentração do licor.

No cultivo feito com 50% do licor no meio, a quantidade de vanilina presente nos momentos de amostragem foi crescente, registrando 21,5 mg/L nos dois primeiros tempos e 25,3 mg/L no último. Enquanto isso, a concentração de ácido p-cumárico foi decrescente durante o tempo de análise, demonstrando mais uma vez a correlação entre esses dois compostos. Ele registrou 242,9 mg/L às 2 horas, 240,7 mg/L às 6 e 220,9 mg/L às 10 horas.

A quantidade de acetovanilona oscilou durante o período analisado, sendo a amostra de 6 horas a que registrou menor concentração do composto, com 377,4 mg/L. As outras duas análises tiveram 433,9 e 386,3 mg/L às 2 e 10 horas, respectivamente.

Neste cultivo foi possível visualizar a presença de ácido vanílico em todos os tempos de amostragem: 7,7 mg/L às 2, 7,8 mg/L às 6 e 6,9 mg/L às 10 horas. O ácido gálico, por sua vez, foi detectado em concentração baixíssima (0,002 mg/L) apenas na primeira amostragem.

Ácido ferúlico teve concentração decrescente durante o tempo de cultivo, apresentando 70,9 mg/L no tempo de 2 horas, 69,2 mg/L às 6 horas e 60,1 mg/L na última amostragem. Estes valores indicam a possibilidade de haver conversão deste composto, assim como de ácido p-cumárico, à vanilina.

No ensaio feito com 10% do extrato adicionado ao meio, mais uma vez as concentrações dos compostos vanilina e ácido p-cumárico foram maiores do que no de 50%. Vanilina apresentou 139,6 mg/L às 2 h, 138,1 mg/L às 6 e 53,7 mg/L às 10 horas de amostragem, caracterizando um padrão de concentração decrescente com queda 61% entre os dois últimos tempos. Já o ácido p-cumárico teve a maior concentração no tempo de 6 horas (534,9 mg/L), seguido por 2 horas (525,5 mg/L) e 10 horas (521 mg/L).

A quantidade de acetovanilona neste ensaio foi menor do que no cultivo anterior, porém teve padrão crescente, tendo 174,4 mg/L às 2 horas, 228,3 mg/L às 6 e 244,8 mg/L às 10 h. De forma contrária, ácido ferúlico teve a concentração diminuída à medida que o tempo de cultivo passava, além de ter registrado quantidade menor

que no ensaio com 50% do extrato – 56,7 mg/L 2 horas, 55,2 mg/L 6 horas e 50,6 mg/L 10 horas.

Foi possível detectar ácido vanílico nos três tempos de amostragem, embora em quantidade baixa: 3,1 mg/L (2 horas) tendo sido a maior concentração encontrada. Por sua vez, ácido gálico não foi encontrado em nenhuma amostra.

A Figura 13 traz a concentração dos compostos nas culturas de *Bacillus cereus* onde foram adicionaram 10 ou 50% dos extratos produzidos com cana-de-açúcar submetida a ozonólise por 10 minutos seguida por extração alcalina.

No cultivo com 50%, a concentração de vanilina foi ligeiramente decrescente, apresentando 25,5 mg/L nas duas primeiras amostragens e 24,5 mg/L na última. O ácido p-cumárico, por sua vez, teve a menor quantidade registrada no tempo de 6 horas, 389 mg/L, e maior às 10 horas de análise: 590,8 mg/L.

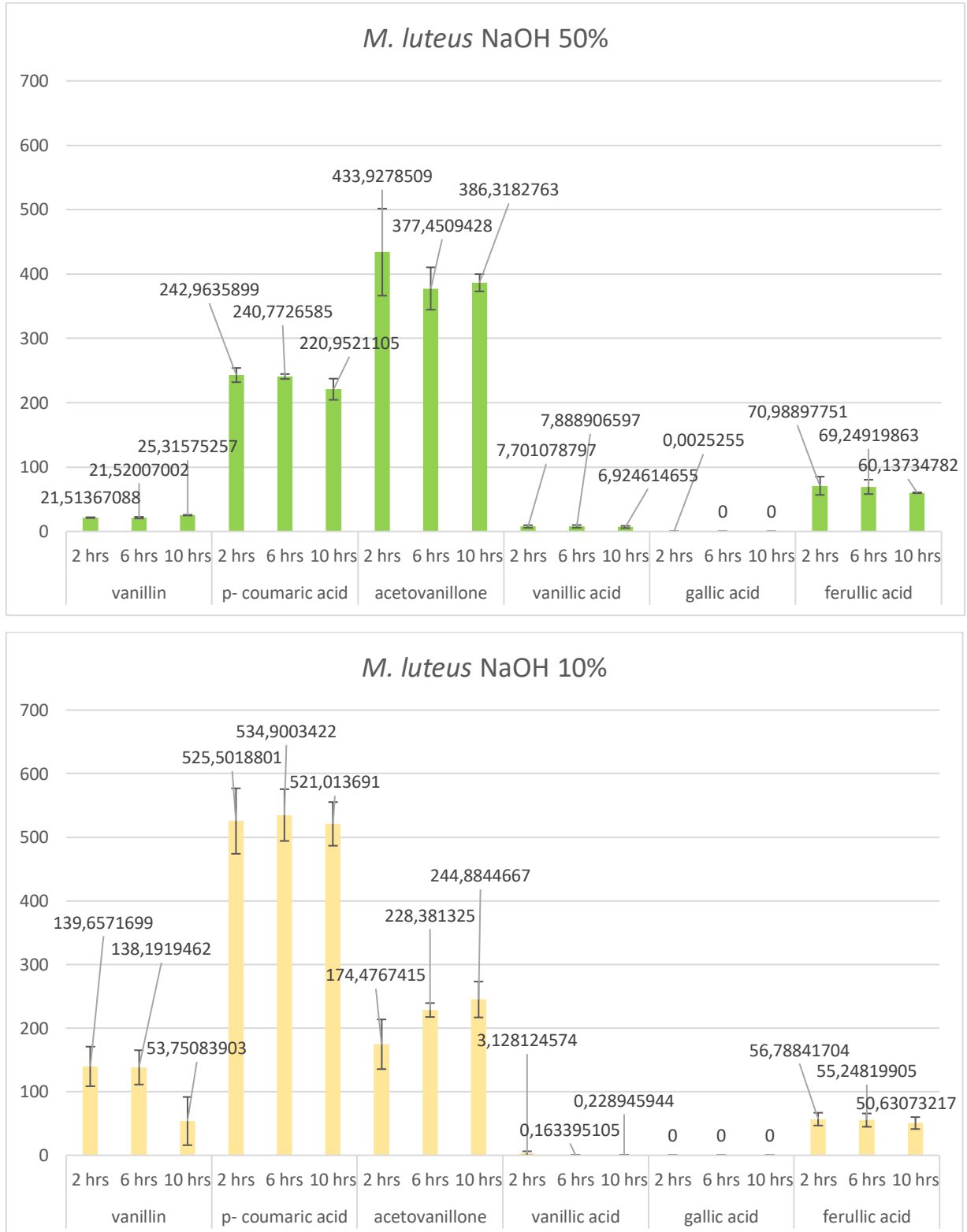
Os valores da concentração de acetovanilona foram crescentes, registrando 254,8 às 2 h, 267,2 mg/L às 6 h e 358,4 mg/L às 10 horas. Já para ácido vanílico e ácido ferúlico as maiores concentrações foram verificadas na amostra das 6 horas, sendo 8,8 mg/L e 96,3 mg/L, nesta ordem. Ácido gálico não foi registrado em nenhum dos tempos amostrados.

No cultivo com 10% do extrato, novamente, as quantidades de vanilina e ácido p-cumárico foram mais elevadas em comparação aos presentes em 50%. Vanilina teve 62,3 mg/L às 2 horas, 63,8 mg/L às 6 horas e 56,3 mg/L às 10 horas, enquanto para ácido p-cumárico verificamos 511,4 mg/L 2 h, 389,2 mg/L 6 h e 590,8 mg/L 10 h. Podemos observar que o aumento da concentração de vanilina, embora pequeno, acontece no mesmo período de tempo em que ocorre a diminuição da concentração de ácido p-cumárico. Além disso, a acetovanilona também apresenta aumento da quantidade do composto no mesmo tempo (119,9 mg/L às 6 h), o que pode indicar uma correlação entre os três compostos.

Neste cultivo não foram encontradas nenhuma concentração de ácido vanílico nos tempos amostrados, porém ácido gálico, que não foi detectado no último ensaio, esteve presente em todas elas, mesmo que em quantidade pequena: 0,2 mg/L às 2 h, 0,3 mg/L às 6 h e 1,1 mg/L as 10 h.

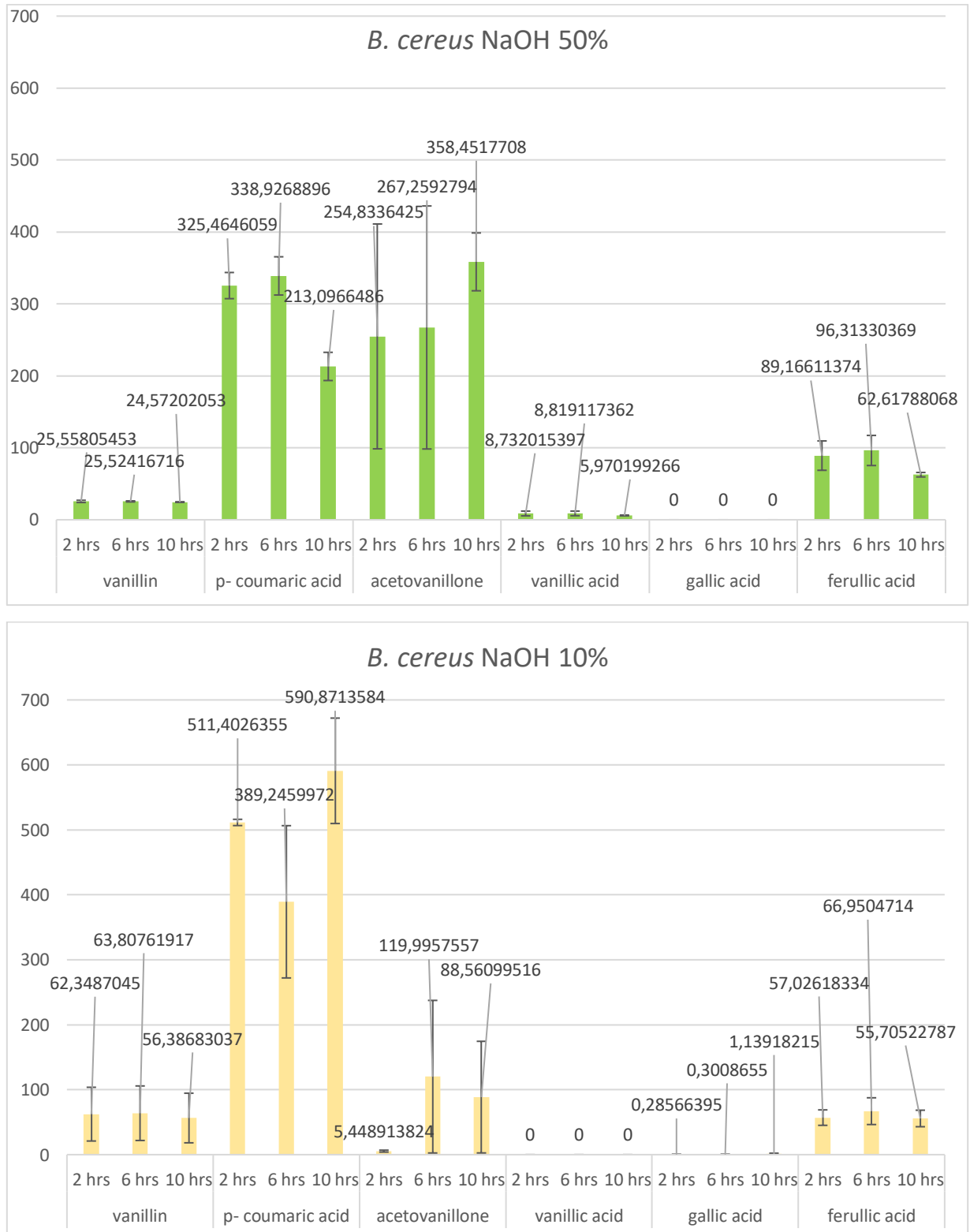
O ácido ferúlico apresentou concentração mais baixa que no cultivo de 50%, entretanto manteve o padrão: a quantidade maior do composto foi verificada no tempo de 6 horas (66,9 mg/L).

Figura 12. Visão geral da concentração de compostos para cada uma das culturas de *M. luteus* cultivadas com licores extraídos com NaOH e submetidos a ozonólise por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou 50% de concentração do licor. Valores expressos em mg/L.



Fonte: Da autora.

Figura 13. Visão geral da concentração de compostos para cada uma das culturas de *B. cereus* cultivadas com licores extraídos com NaOH e submetidos a ozonólise por 10 minutos. As culturas apresentavam 10% ou 50% de concentração do licor. Valores expressos em mg/L.



Fonte: Da autora.

6.2.3. Compostos

6.2.3.1. Vanilina

Entre os cultivos preparados com 10 ou 50% do licor de cana-de-açúcar submetido à ozonólise por 10 minutos e extraído através do método hidrotérmico (Figura 14), o que apresentou maior produção de vanilina foi aquele onde havia 10% do extrato e o microrganismo *Micrococcus luteus*. Neste ensaio verificamos um crescimento acentuado na produção do composto já nas primeiras horas de cultivo: a amostra de 2 horas teve concentração 97% maior que o extrato, porém a maior quantidade registrada foi na análise de 10 horas com 145,2 mg/L.

O experimento realizado com a mesma concentração de extrato e com *Bacillus cereus* também apresentou uma produção considerável de vanilina, com sua maior quantidade verificada às 6 horas de cultivo (95,1 mg/L), embora esta concentração seja cerca de 34% menor que a mais alta do cultivo anterior.

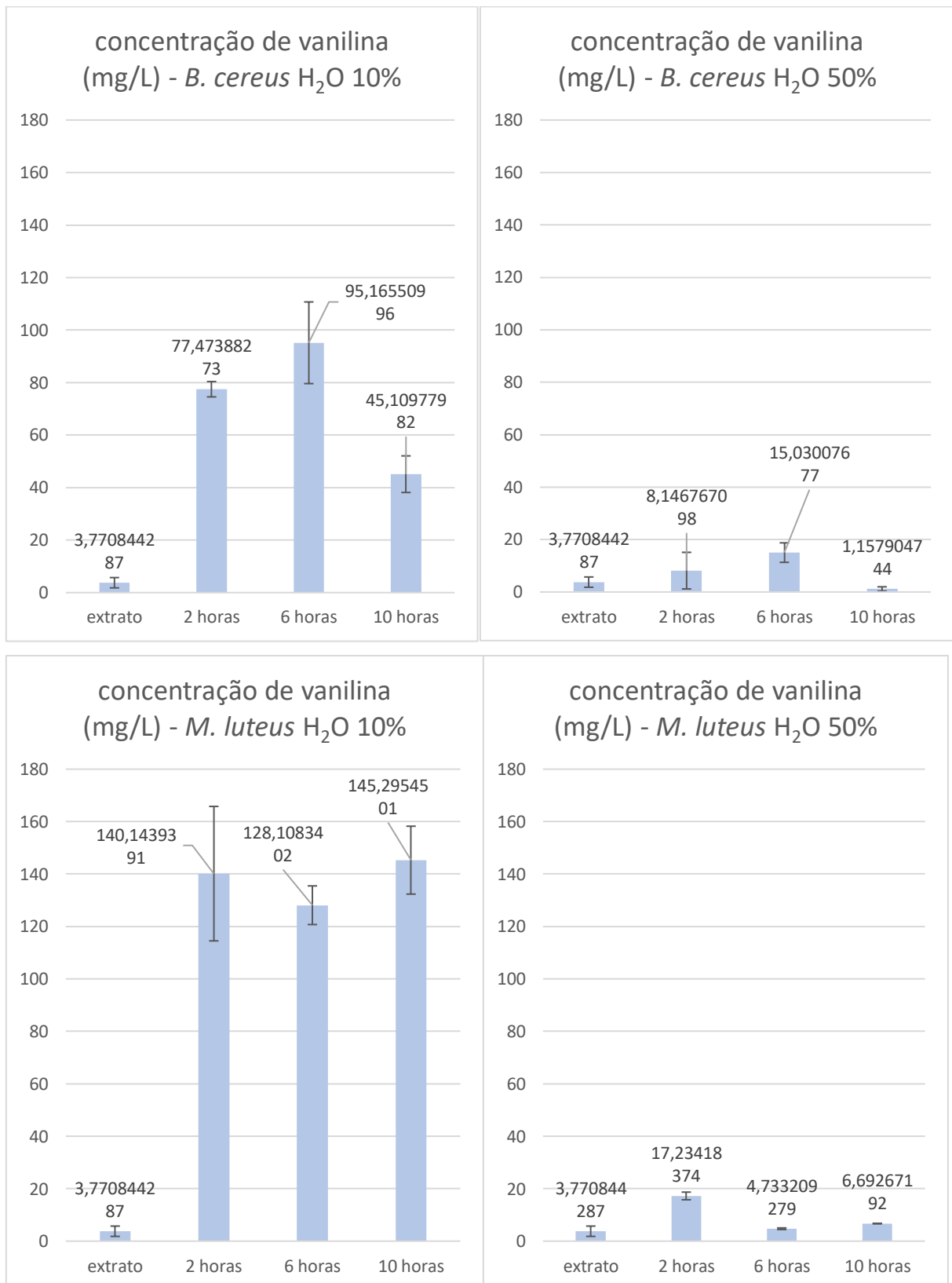
Nos ensaios preparados com 50% do extrato a produção de vanilina foi mais singela, com valores mais altos de 15 mg/L às 6 horas do cultivo com *B. cereus* e de 17,2 mg/L às 2 horas do cultivo de *M. luteus*.

Nesse interim, os ensaios preparados com extratos derivados da extração pelo método alcalino (Figura 15) obtive-se os mesmos padrões na produção de vanilina, sendo o cultivo com maior concentração do composto aquele no qual foram adicionados 10% do licor e *M. luteus*. Mais uma vez a produção foi bastante alta já no início do cultivo saindo de 21,2 mg/L para 139,6 mg/L nas primeiras 2 horas. Posteriormente houve uma queda de $\pm 60\%$ na concentração de vanilina entre as 6 e as 10 horas de cultivo.

Assim como no ensaio com extratos hidrotérmicos, no alcalino com 50% do licor adicionado a produção de vanilina foi baixa tendo uma média de apenas 4 mg/L a mais do que o valor inicial presente no extrato.

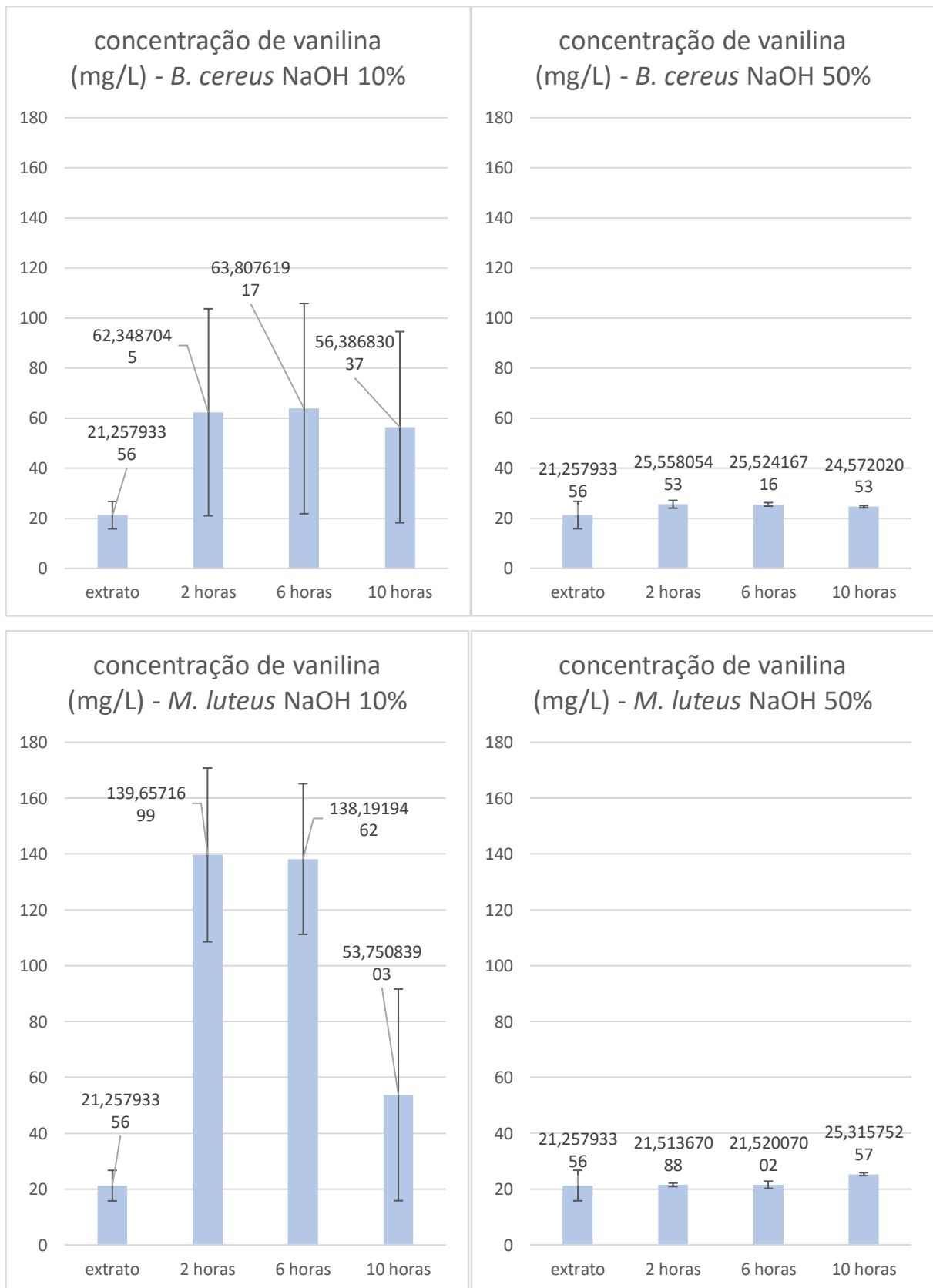
Com esses dados, conclui-se que o tipo de cultivo que apresenta maior produção de vanilina, entre todos os tipos experimentados, é aquele com 10% de concentração dos extratos e *Micrococcus luteus*. Entre os dois tipos de extratos utilizados, o obtido através do método hidrotérmico exibe maior quantidade do composto de interesse.

Figura 14. Concentração de vanilina (mg/L) em cultivados preparados com 10 ou 50% de licores extraídos com H₂O.



Fonte: Da autora.

Figura 15. Concentração de vanilina (mg/L) em cultivados preparados com licores extraídos com NaOH.



Fonte: Da autora.

6.2.3.2. Ácido p-cumárico

Os cultivos realizados com o extrato proveniente da cana-de-açúcar tratada com ozonólise por 10 minutos e submetida a extração pelo método hidrotérmico (Figura 1) apresentou baixa variação nas concentrações de ácido p-cumárico, tanto em 10% quanto em 50% de extrato no meio. A maior variação, e conseqüente maior concentração, do composto observada nestes ensaios foi no cultivo com 10% e *Micrococcus luteus*, onde a quantidade foi de 32,5 mg/L no extrato para 52,2 mg/L nas primeiras 2 horas.

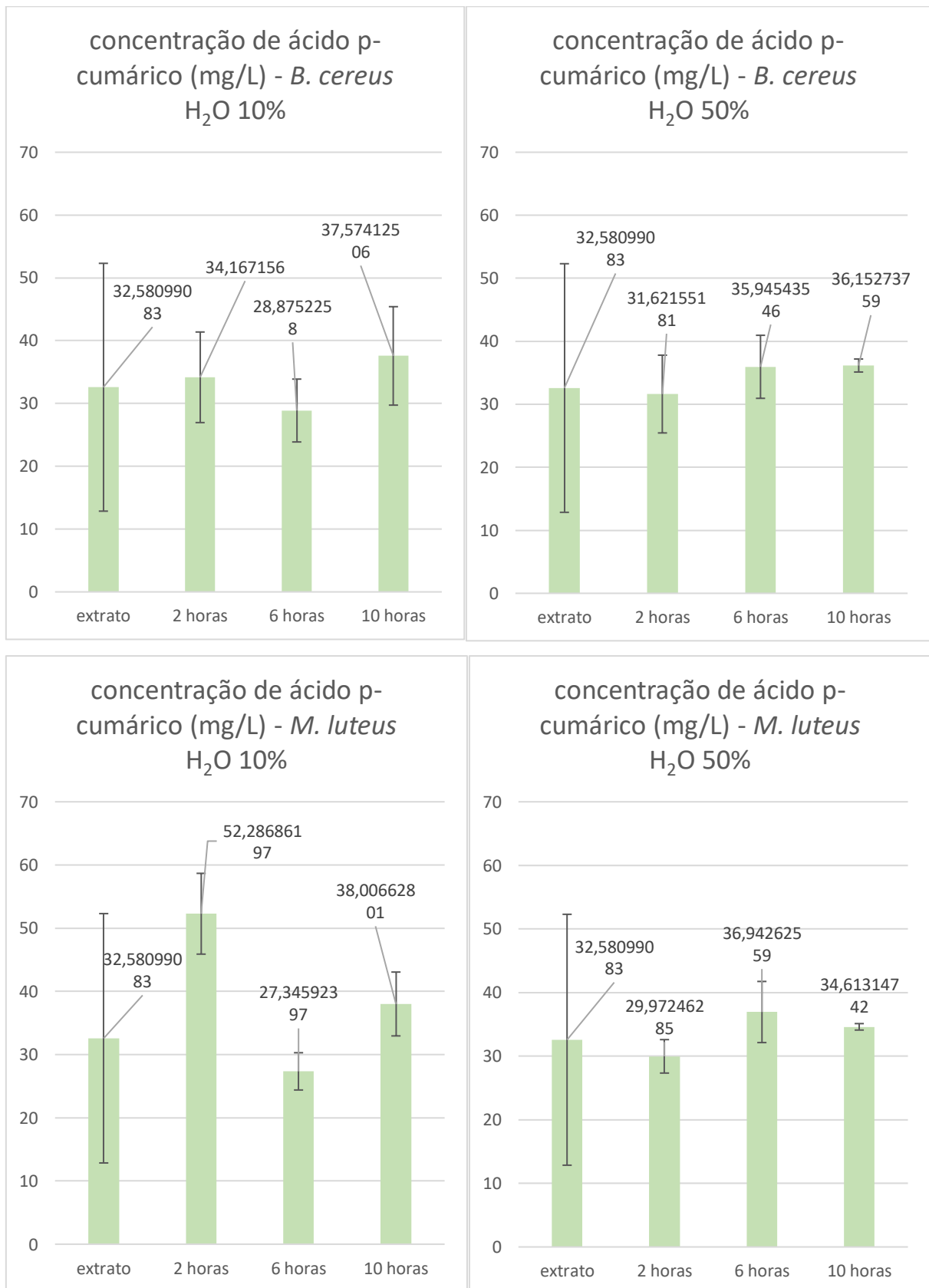
Neste tipo de cultivo não houve diferença significativa nas concentrações de ácido p-cumárico em razão da quantidade do extrato adicionada ao meio. Ao contrário do que é observado nos ensaios realizados com extrato proveniente de extração alcalina: nestes, é possível observar uma maior produção do composto nos meios com 10%.

Nos cultivos alcalinos (Figura 17), o experimento que obteve maior quantidade de ácido p-cumárico foi aquele com 10% do extrato e cultivado com *B. cereus*, obtendo 590,8 mg/L às 10 horas. Os ensaios com a mesma porcentagem, porém feitos com *M. luteus*, também apresentaram quantidade alta do composto sendo sua concentração mais alta às 6 horas com 534,9 mg/L.

Já os experimentos montados com 50% do extrato adicionado ao meio tiveram quantidade de ácido p-cumárico pouco menor, obtendo 338,9 mg/L em sua amostra de maior concentração – *B. cereus* 6 horas. O cultivo feito com *M. luteus* obteve, em sua quantidade mais alta, 242,9 mg/L às 2 horas.

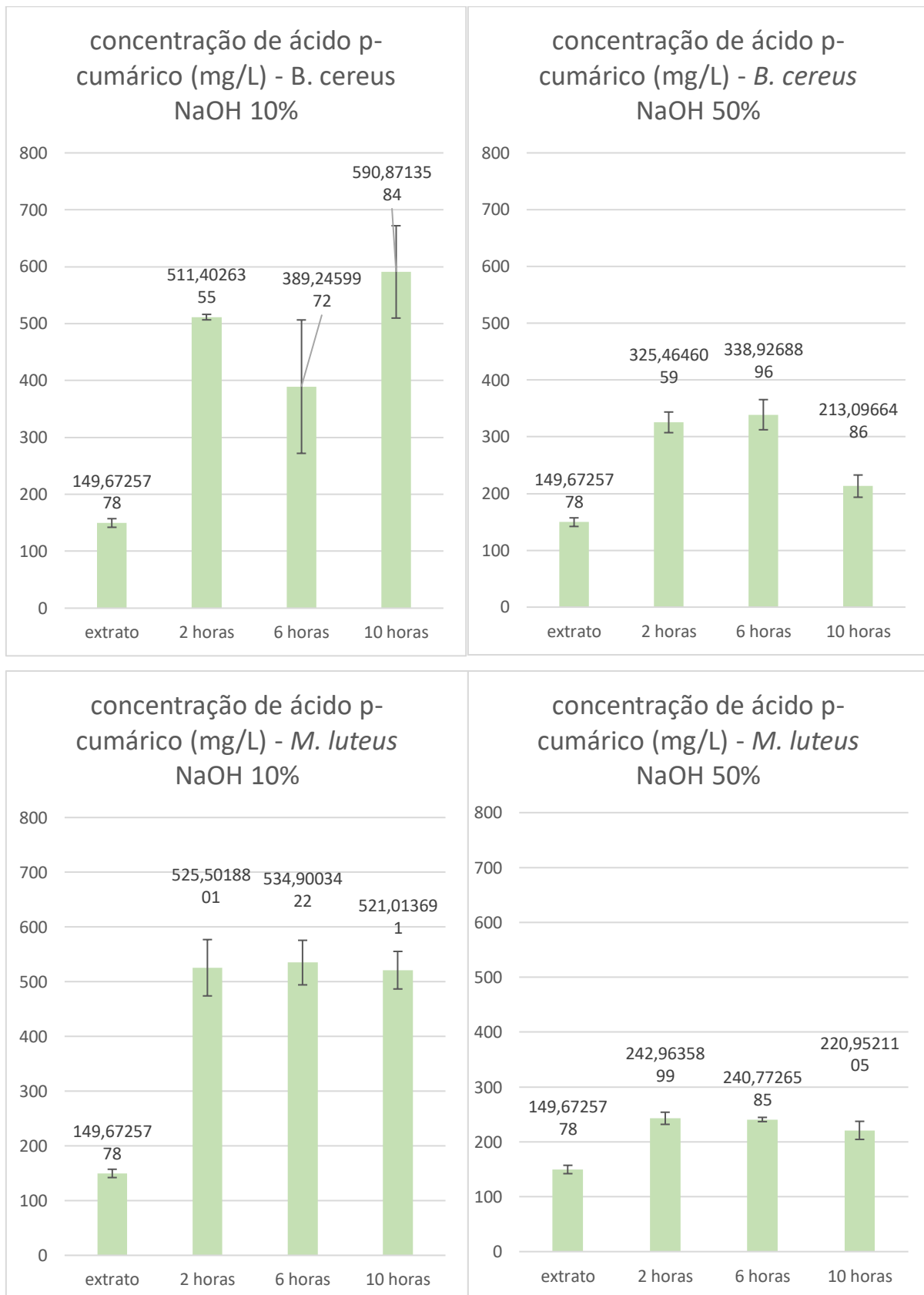
Quando traçamos paralelos entre o que observamos nas concentrações de vanilina e ácido p-cumárico, verificamos que *M. luteus* consegue fazer de forma mais eficiente a conversão de ácido p-cumárico à vanilina, visto que são nos cultivos deste microrganismo que vemos uma quantidade maior de um enquanto o outro tem concentração mais baixa. De forma complementar, os cultivos de *B. cereus* apresentam a vanilina em concentração mais baixa e o ácido p-cumárico mais alto.

Figura 16. Concentração de ácido p-cumárico (mg/L) em cultivados preparados com licores extraídos com H₂O.



Fonte: Da autora.

Figura 17. Concentração de ácido p-cumárico (mg/L) em cultivados preparados com licores extraídos com NaOH.



Fonte: Da autora.

6.2.3.3. Ácido ferúlico

Os níveis de ácido ferúlico foram verificados nos cultivos feitos com concentração de 10 ou 50% dos extratos obtidos a partir da ozonólise por 10 minutos da cana-de-açúcar que, em seguida, também foi submetida a extração hidrotérmica (Figura 18). Neles, observamos que a quantidade do composto foi baixa, principalmente naqueles com porcentagem maior do licor no meio, onde atingiu a máxima de 1,02 mg/L às 10 horas no cultivo com *B. cereus*.

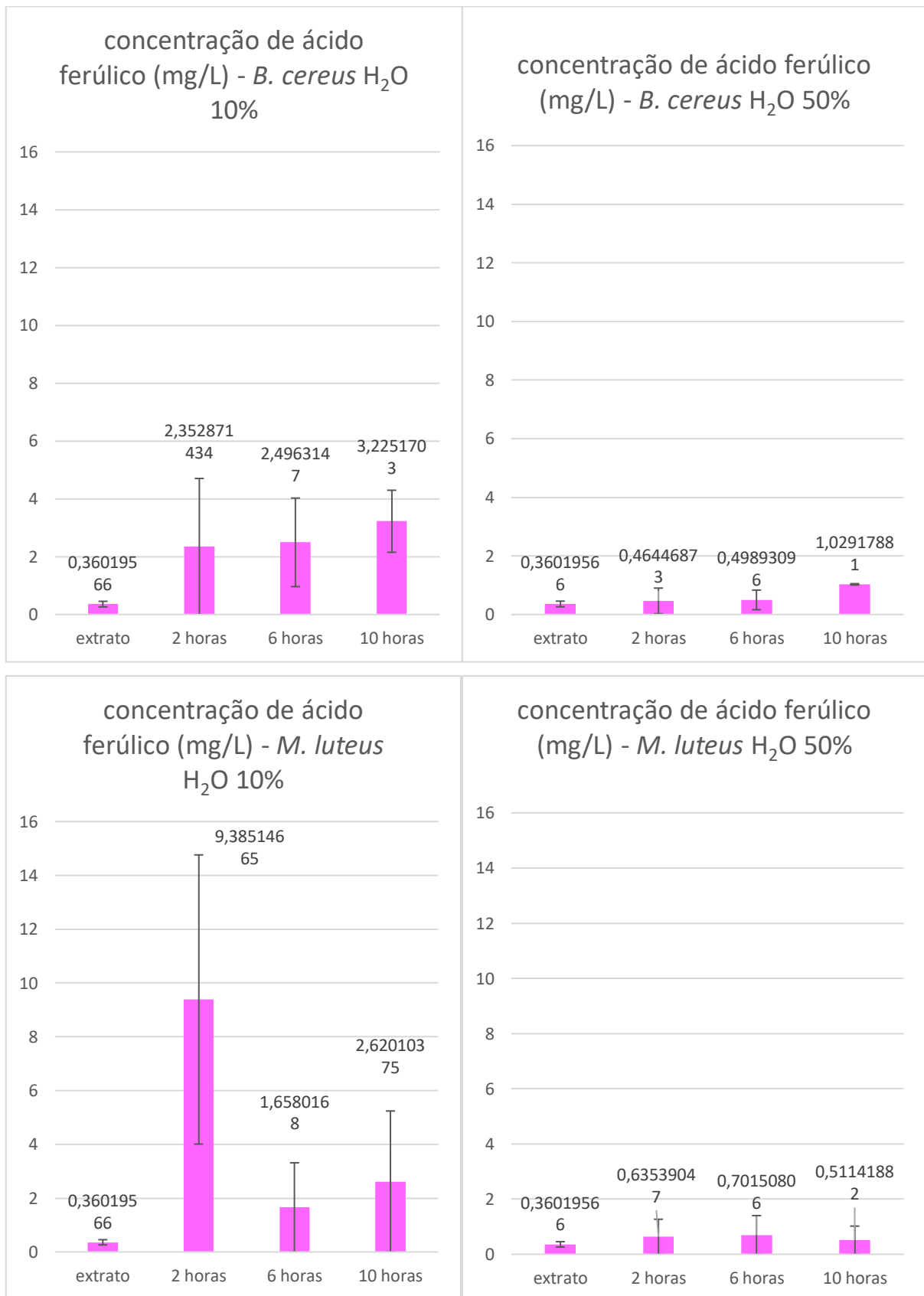
Enquanto isso, nos ensaios produzidos com 10% do licor as concentrações de ácido ferúlico obtidas foram maiores, chegando a 9,38 mg/L às duas horas do cultivo feito com *M. luteus*, um aumento de 96% em comparação com a concentração do extrato. No produzido com *Bacillus cereus* a produção máxima ocorreu as 6 horas, com um total de 2,49 mg/L.

Os ensaios produzidos com licor proveniente da extração com método alcalino (Figura 19) tiveram registradas quantidades mais altas de ácido ferúlico, mas, ao contrário do observado na condição anterior, as concentrações maiores foram encontradas nos meios com 50% do extrato. No cultivo com *B. cereus* a concentração máxima chegou à 96,3 mg/L na amostra das 6 horas, enquanto no cultivo com *M. luteus* a maior quantidade foi de 70,9 mg/L na amostragem das 2 horas.

Em experimento feito com 10% do extrato, o cultivo com *B. cereus* também foi o que obteve maior concentração de ácido ferúlico, com 66,9 mg/L às 6 horas. *M. luteus* apresentou máxima de 56,7 mg/L (2 horas). Podemos observar que o padrão de concentração se manteve em ambos os cultivos (com 10 e 50%), pois as amostras em que observamos maior quantidade do composto foi a mesma: 6 horas para *B. cereus* e 2 horas para *M. luteus*.

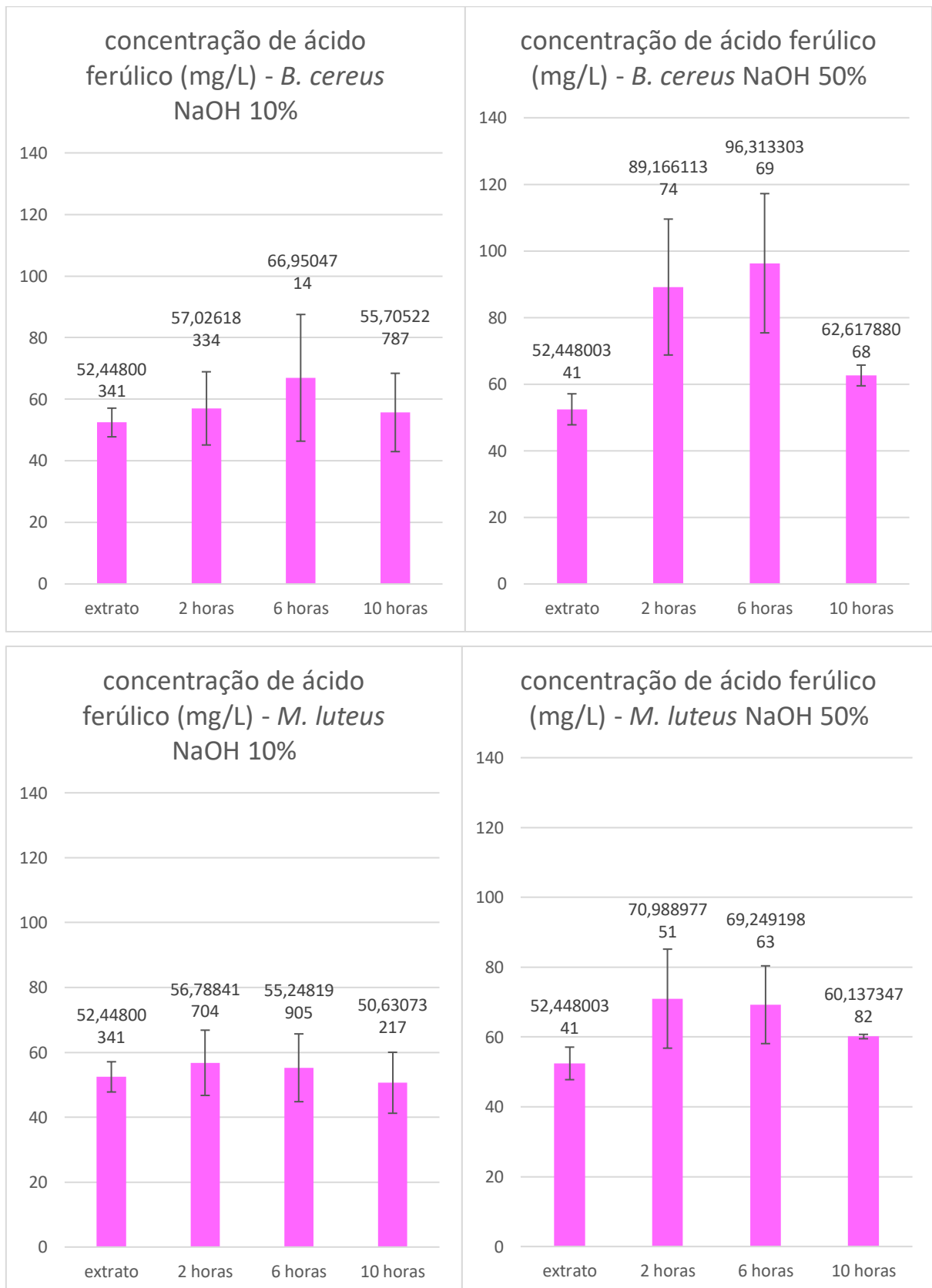
Assim como o observado para ácido p-cumárico, quando vemos os gráficos de concentração do ácido ferúlico podemos traçar paralelos entre a quantidade dele no meio e a de vanilina: enquanto um aumenta, o outro diminui. Este fator corrobora a hipótese de que as vias de síntese da vanilina que estão ocorrendo no cultivo são as que partem do ácido p-cumárico e a que é proveniente do ácido ferúlico.

Figura 18. Concentração de ácido ferúlico (mg/L) em cultivados preparados com licores extraídos com H₂O.



Fonte: Da autora.

Figura 19. Concentração de ácido ferúlico (mg/L) em cultivados preparados com licores extraídos com NaOH.



Fonte: Da autora.

6.2.3.4. Acetovanilona

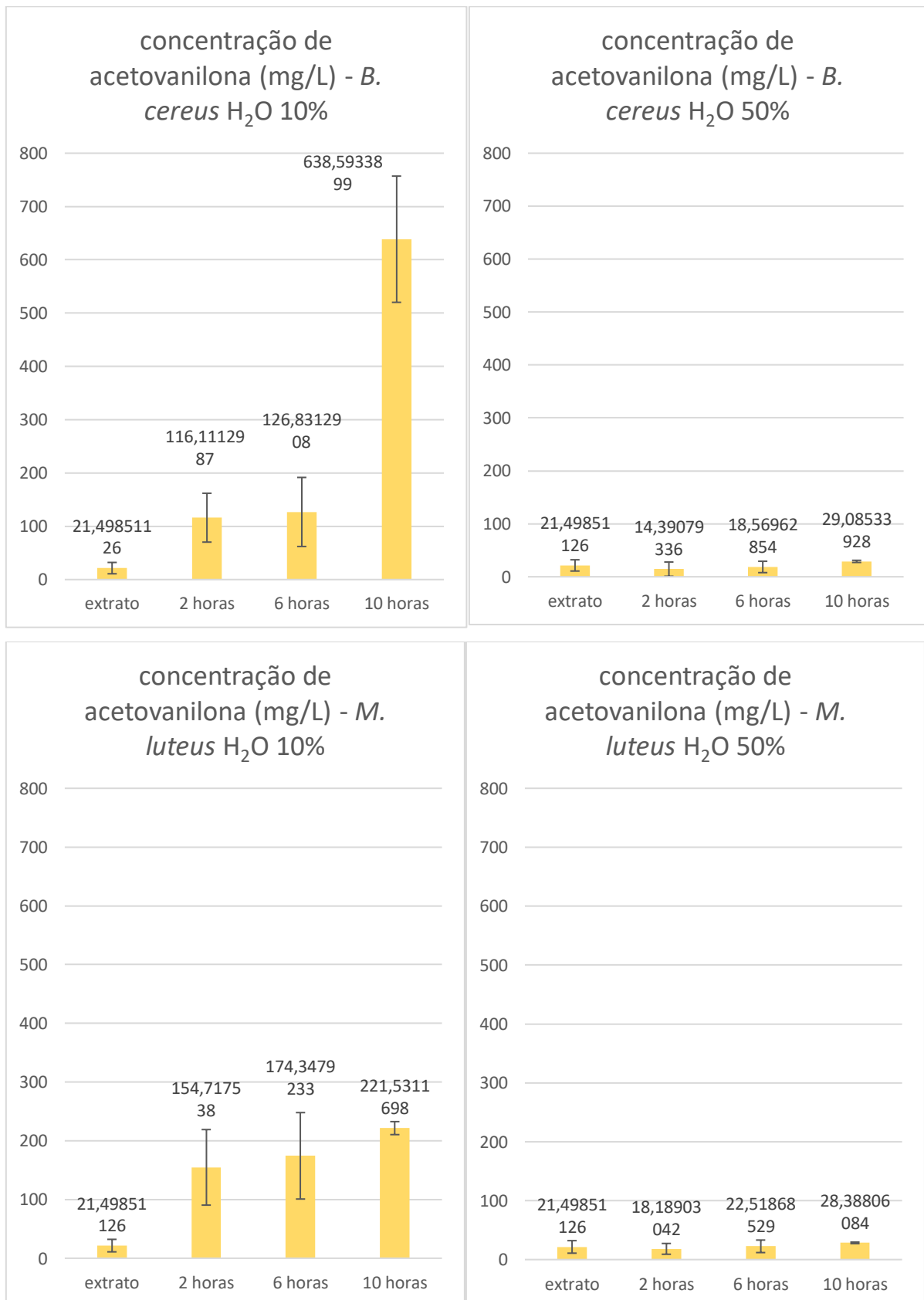
Nos cultivos realizados com licores preparados a partir de cana-de-açúcar tratada com ozonólise por 10 minutos e, em seguida, submetida a extração pelo método hidrotérmico (Figura 20), o ensaio que apresentou maior concentração de acetovanilona foi aquele onde foi adicionado 10% do extrato e *Bacillus cereus*. Nele, ocorreu um aumento expressivo entre as 6 e 10 horas de cultivo, partindo de 126,8 mg/L para 638,5 mg/L – crescimento de 5x na quantidade do composto. No ensaio com a mesma porcentagem de licor, porém realizado com *Micrococcus luteus*, o crescimento foi menos acentuado oscilando entre os 154,7 mg/L (2 horas) a 221,5 mg/L (10 horas).

Quando analisamos a concentração de acetovanilona nos cultivos com 50% do licor, vemos o mesmo padrão: a maior quantidade do composto está presente no meio com *B. cereus*: com 29 mg/L, fica menos de 1 mg/L acima do maior valor encontrado no ensaio com *M. luteus* (28,3 mg/L), ambos em suas respectivas amostras de 10 horas.

Ao contrário dos cultivos com licor derivado da extração hidrotérmica, que apresentaram maior concentração de acetovanilona com 10%, os ensaios feitos com os extratos alcalinos (Figura 21) tiveram suas maiores concentrações reportadas com 50% do licor no meio. O cultivo com quantidade mais elevada do composto foi o que utilizou *M. luteus* como microrganismo, chegando a 433,9 mg/L na primeira análise (2 horas), um aumento de 99% da concentração em comparação ao extrato puro. O ensaio com *B. cereus*, por sua vez, teve quantidade mais alta na última amostra analisada: média de 358,4 mg/L.

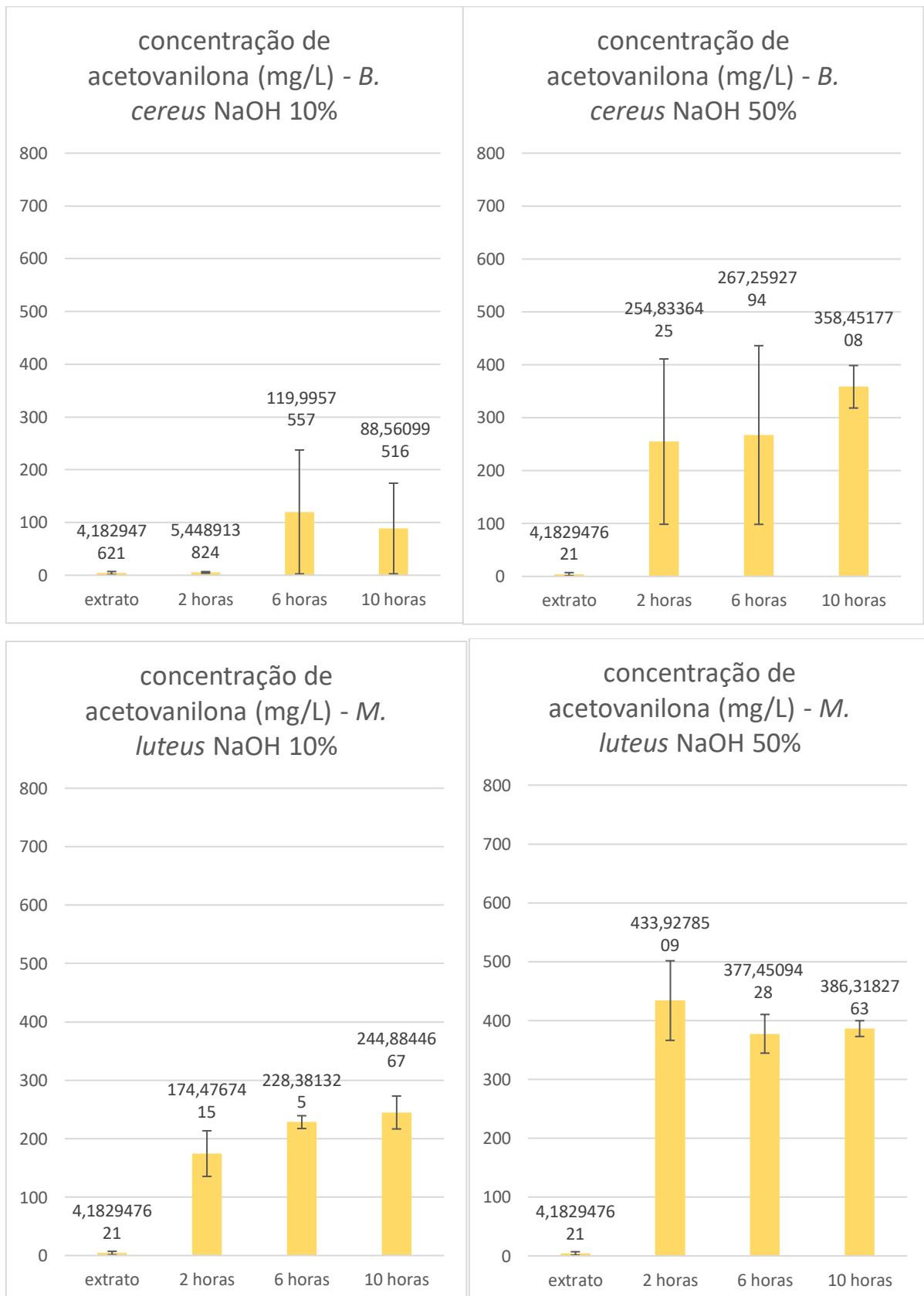
Os cultivos onde foram adicionados apenas 10% do extrato apresentaram concentração similar aos do cultivo com extrato hidrotérmico (excetuando-se os 638,5 mg/L encontrados no ensaio de *B. cereus* em 10%, na última análise): por volta de 200 mg/L. A amostra com maior concentração em *B. cereus* obteve 119,9 mg/L (6 horas) e em *M. luteus* 244,8 mg/L (10 horas).

Figura 20. Concentração de acetovanilona (mg/L) em cultivados preparados com licores extraídos com H₂O.



Fonte: Da autora.

Figura 21. Concentração de acetovanilona (mg/L) em cultivados preparados com licores extraídos com NaOH.



Fonte: Da autora.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste permitiram concluir que as bactérias *M. luteus* e *B. cereus* foram capazes de tolerar e transformar compostos presentes em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ozônio e hidrolisado hidrotermicamente somente com água e com álcali.

Os dados cromatográficos evidenciaram que compostos como vanilina e acetovanilona são produtos dessa biotransformação e, a diminuição das concentrações de ácido ferúlico ao longo da produção desses compostos, sugere ser este o substrato precursor desse processo de biotransformação. Embora o ácido cumárico tenha sido detectado em todas as amostras, não se observou correlação entre esse composto e a produção de vanilina.

M. luteus foi o microrganismo que produziu a maior quantidade de vanilina tendo como meio de cultivo onde estava presente apenas 10% do licor advindo da extração hidrotérmica, portanto a maior produção se deu em ensaios com a menor concentração do extrato, sendo esse o extrato economicamente e ambientalmente melhor.

Os resultados gerais mostram a viabilidade de se obter compostos de importância econômica, como vanilina e acetovanilona, a partir de bagaço de cana hidrolisado usando cultivo microbiano.

A partir destes, os próximos passos a serem dados na obtenção das substâncias envolvem a identificação dos genes responsáveis pela sua produção, seu isolamento e implementação em biossinas (*E. coli* entre os organismos mais utilizados) para produção, por exemplo, das enzimas relacionadas no processo.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R. Cana-de-açúcar. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html. Acesso em: 08 de abril de 2020.

APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. ed. 20, Washington, American Public Health Association, p. 2-42, 1998.

ASAE. *Bacillus cereus*. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Orgão de Polícia Criminal. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/bacillus-cereus.aspx>. Acesso em: 10 de março de 2021.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 62, n. 3, p. 293–300, set. 1951.

BURRI, J., GRAF, M., LAMBELET, P., LÖLIGER, J. Vanillin: more than a flavouring agent—a potent antioxidant. *J. Sci. Food Agric.* 48, 49–56, 1989.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *Journal of bacteriology*, v. 41, n. 5, p. 653–73, maio 1941.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25, 2013.

CHANDRAKANTH, M.S; HONEYMAN, B.D; AMY, G.L. Modeling the interactions between ozone, natural organic matter, and particles in water treatment. *Colloids and Surfaces.* v.107, p.321-342. Environmental Research Laboratory, 1996

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, v. 2, n. 1, p. 121–145, 2011.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar. p. 16, 2021.

CONTRERAS IGLESIAS. S. Degradation and biodegradability enhancement of nitrobenzene and 2.4-dichlorophenol by means of Advanced Oxidation Processes based on ozone. Departament d'Enginyeria Quimica i Metallurgia. Universitat de Barcelona, 2003.

CRIEGEE, R. Mechanism of Ozonolysis. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 14, n. 11, p. 745–752, 1975.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. *Química Nova*, v. 28, p. 642-645, 2005.

DIAS, M.O.S. et al. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Applied Energy*, v. 109, p. 72–78, 2013.

DIXON R. A. Vanillin Biosynthesis - Not as Simple as it Seems? *Handbook of Vanilla Science and Technology*, 292–298. 2010. doi:10.1002/9781444329353.ch18

DZIALO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 160, 2016.

ESPOSITO, L. J. et al. Vanillin. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th edition (24, 812–825). New York: John Wiley & Sons. 1997.

FITZGERALD, D.J., STRATFORD, M. and NARBAD, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Intl. J. Food Microbiol.* (in press), 2003.

GONÇALVES, C. Aplicação de agentes oxidantes no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e sua influência na sacarificação da celulose. p. 74, 2009.

GUIL-GUERRERO, J.L. et al. Antimicrobial activity of plant-food by-products: a review focusing on the tropics. *Livest. Sci.* 189, 32–49, 2016.

HAMELINCK, C. N. et al. Etanol from lignocellulosic biomass: technoeconomic performance in short, middle and long term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, 2005.

HELENO, S. A., et al. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chem.* 173, 501–513, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>.

HENG, S; YEUNG, L.K; DJAFER, M; SCHROTTER, J.C. A novel membrane reactor for ozone water treatment. *Journal of Membrane Science*. V 289, p.67-75. 2007.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 9 fev. 2007.

HOCKING, M.B. Vanillin: synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *Journal of Chemical Education*, n. 74, p. 1055-1059, 1997.

HUNTER, W. J.; MANTER, D. K.; VAN DER LELIE, D. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Enterobacter soli* and *E. aerogenes*. *Current Microbiology*, v. 65, n. 6, p. 752–757, 2012.

IPEA. Plano Nacional de Resíduos Sólidos: diagnóstico dos resíduos urbanos, agrosilvopastoris e a questão dos catadores. *Comunicados do IPEA*, v. 145, p. 1–15, 2012.

JOSEPH, S.; ERNING, X. Ophthalmic solution with a flavoring agent. 2006

KLEISER, G.; FRIMMEL, F. H. Removal of precursors for disinfection by-products (DBPs) – differences between ozone- and OH-radical-induced oxidation, *Science of the Total Environment*, v. 256, p. 1-9, 2000.

BECKER, K.; DAVID, M. Z.; SKOV, R. L.; VON EIFF, C.; 2019. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci, Manual of Clinical Microbiology*, 12th Edition. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781683670438.MCM.ch22

MAIA, E. P.; COLODETTE, J. L. Efeito do conteúdo e da natureza da lignina residual na eficiência e na seletividade do branqueamento com ozônio. *Revista Árvore*, v.27, n.2, p.217- 232, 2003

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; SUDHEESH, S. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 44, n. 2, p. 48–52, fev. 2007. MO.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

ORTEGA, J. O. et al. Enhancing the production of the fermentable sugars from sugarcane straw: A new approach to applying alkaline and ozonolysis pretreatments. *Renewable Energy*, v. 164, p. 502–508, 1 fev. 2021.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. et al. Separation of phenolic compounds by high performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 912, n. 2, p. 249–257, abr. 2001.

ROOPAN, S. M. An overview of natural renewable biopolymer lignin towards nano and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 103, p. 508–514, 2017.

ROSAZZA, J. P. N. et al. Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 472–479, 1995.

ROTHFUSS, P. *The Wise Man's Fear: The Kingkiller Chronicle*. Brasil: Arqueiro, p. 545, 2011.

SANTOS, M. B. C. DOS. Biotransformação bacteriana de ácido ferúlico obtido de resíduo lignocelulósico a 4-vinilguaiacol. 2018.

SANTOS, M. B. C., SCARPASSA, J. A., MONTEIRO, D.A, LADINO-ORJUELA, G., DA SILVA, R., BOSCOLO M., GOMES, E. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7 Brazilian Journal of Microbiology, p 1-9, 2021. doi.org/10.1007/s42770-021-00462-x.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, et al. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, v. 101, n. 12, p. 4721–4724, 1 jun. 2010.

SILVA, B. C. DA. Ozonólise da biomassa lignocelulósica (bagaço de cana) visando a redução do teor de lignina e do ácido p-Cumárico. 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

TAOFIQ, O., et al. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. Molecules 22. 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>.

TAOFIQ, O., et al. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics-a review. Ind. Crops Prod. 90, 38–48, 2016.

WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanillin. Phytochemistry, v. 63, n. 5, p. 505–515, 2003.

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