

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TATIANE FRANCINI KNAUL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOAROMA A PARTIR DA
BACTÉRIA *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2021

TATIANE FRANCINI KNAUL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOAROMA A PARTIR DA
BACTÉRIA *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Priscila Vaz de Arruda
Coorientador: Dr. Renato Eising

TOLEDO
2021

TATIANE FRANCINI KNAUL

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOAROMA A PARTIR DA
BACTÉRIA *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal
do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 20 de agosto de 2021

Caroline Mariana de Aguiar
Titulação (Doutorado)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Luiz Felipe Minozzo Figueiredo
Titulação (Doutorado)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Priscila Vaz de Arruda
Titulação (Doutorado)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

TOLEDO

2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar este trabalho de conclusão de curso para meus pais Volnei Knaul e Adelete Sieves Knaul e ao meu querido avô (*in memoriam*), e minha querida avó que não mediram esforço para me manter na universidade, que sempre me incentivaram, e que foram o meu alicerce.

Do mesmo modo, agradeço as minhas irmãs, Aline e Luana Knaul por todo apoio dado nesta jornada, por sempre ser o meu consolo quando precisei.

Agradeço por todos os meus professores que contribuíram para a minha formação acadêmica, em especial, a minha professora orientadora Doutora Priscila Vaz de Arruda e meu coorientador professor Doutor Renato Eising por todos os ensinamentos, por todos os conselhos, por me incentivar e principalmente por acreditar no meu trabalho.

Agradeço aos amigos que fiz nesta caminhada em especial a Adrieli, Latoya, Anderson, Luciana, Schaline, Diego e Gabrielle por sempre ser o suporte, o ombro amigo e por tornarem esse caminho mais leve.

Agradeço ao meu namorado, Guilherme Wagner por ser essa pessoa companheira, compreensiva e por sempre me incentivar e acreditar em mim.

Agradeço aos técnicos de laboratórios, Danielle, Carol, Iraúza e Rafael por sempre passarem os conhecimentos práticos e por sempre estarem dispostos a ajudar em tudo que fosse necessário.

Agradeço ao laboratório o Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA) pelo suporte dado a pesquisa, ao professor Doutor Ricardo Zara, por permitir a realização do meu trabalho.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a minha jornada acadêmica.

**“Grandes conquistas não
acontecem com pessoas pequenas.”**

(Autor desconhecido).

RESUMO

A vanilina, aroma predominante da baunilha, é o aroma mais apreciado e utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e de perfumaria. A baunilha natural é obtida através de um laborioso processo de maturação da vagem da orquídea do gênero *Vanilla*. No entanto, este processo apresenta diversas limitações como o baixo rendimento, o alto custo e as influências sazonais que interferem na qualidade do produto. Diante disso, diversas abordagens biotecnológicas têm sido realizadas com o objetivo de produzir este aditivo alimentício por via biotecnológica, através da utilização diversos microrganismos e indutores. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a obtenção biotecnológica da produção de vanilina por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 na presença de dois indutores, isoeugenol (indutor comercial) e ácido ferúlico (extraído de sabugo de milho). Inicialmente, os experimentos foram realizados com o indutor comercial a fim de se avaliar as condições que pudessem favorecer a produção do bioproduto. Assim, avaliou-se o tempo de adição do isoeugenol, sendo estes, no início da fermentação e após 24 horas do cultivo. Posteriormente, três concentrações deste indutor (5,0; 10,0 e 15,0 g/L) foram avaliadas quanto à influência na formação celular, consumo de substrato e seu consumo durante a fermentação. Após a obtenção dos resultados que favoreceram este bioprocessos em relação ao tempo de adição, bem como em função da concentração do indutor comercial, avaliou-se o potencial do ácido ferúlico, extraído do sabugo de milho, como fonte alternativa de indutor e sua capacidade em conversão à vanilina. De acordo com os resultados, verificou-se que o melhor tempo de adição do isoeugenol ocorreu após 24 horas de cultivo e que a concentração que favoreceu a maior produção de biomassa celular (10,89 g/L \pm 0,39) e ao mesmo tempo maior produção de vanilina (0,6 g/L) foi a de 10 g/L deste indutor. Já o maior rendimento molar de conversão de isoeugenol em vanilina (7,48%) foi obtido com 5 g/L de isoeugenol. Com relação à extração de ácido ferúlico do sabugo de milho, alcançou-se concentração de 3,4 g/L, porém a adição deste ao meio de fermentação resultou na possível inibição do crescimento celular, bem como não foi possível observar a produção de vanilina, provavelmente em função desta concentração ter levado à morte das células.

Palavra-chave: Vanilina. Isoeugenol. Ácido ferúlico. Sabugo de milho.

ABSTRACT

Vanillin, the predominant aroma of vanilla, is the most appreciated and used aroma in the food, pharmaceutical and perfume industry. Natural vanilla is obtained through a laborious process of maturation of orchid pods of the *Vanilla* genus. However, this process has limitations such as low yield, high cost and seasonal influences that affect the quality of the final product. Therefore, several biotechnological approaches are being carried out with the objective of producing this food additive by biotechnological way, through the use of several microorganisms and inducers. In this sense, the present work aimed to evaluate a biotechnological approach to vanillin production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in the presence of two inducers, isoeugenol (commercial inducer) and ferulic acid (extracted from corn cob). Initially, the experiments were carried out with the commercial inducer in order to evaluate the conditions that could favor the production of the bioproduct. Thus, the time of isoeugenol addition was evaluated, being these, at the beginning of fermentation and after 24 hours of cultivation. Subsequently, three options of this inducer (5.0, 10.0 and 15.0 g/L) were evaluated for their influence on cell formation, substrate consumption and its consumption during fermentation. After obtaining the results that favored this bioprocess in relation to the time of addition, as well as in function of the concentration of the commercial inducer, the potential of ferulic acid, extracted from corn cob, as an alternative source of inducer and its capacity in Conversion to vanillin. According to the results, it was found that the best isoeugenol addition time occurred after 24 hours of cultivation and that the concentration that favored the highest production of cell biomass (10.89 g/L \pm 0.39) and at the same time the highest production of vanillin (0.6 g/L) was that of 10 g/L of this inducer. The highest molar yield of isoeugenol to vanillin conversion (7.48%) was built with 5 g/L of isoeugenol. Regarding the extraction of ferulic acid from the corn cob, a concentration of 3.4 g/L was reached, but its addition to the fermentation medium resulted in a possible inhibition of cell growth, as well as it was not possible to observe the production of vanillin, probably because this concentration led to cell death.

Keyword: Vanillin. Isoeugenol. Ferulic acid. Corn cob.

LISTA DE FIGURA

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema ilustrativo da hidrólise enzimática de gluco-vanilina em glicose e vanilina | 23 |
| Figura 2 - Compostos petroquímicos convertidos a vanilina | 24 |
| Figura 3 - Vias microbianas de obtenção de vanilina | 26 |
| Figura 4 - Provável rota de formação de vanilina por <i>Bacillus subtilis</i> a partir de isoeugenol..... | 34 |
| Figura 5 - Coloração de gram do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 42 |
| Figura 6 - Avaliação do tempo de adição de isoeugenol sobre a concentração celular durante a fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 43 |
| Figura 7 - Avaliação do crescimento celular pela adição de diferentes concentrações de isoeugenol durante a fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 45 |
| Figura 8 - Avaliação do consumo de diferentes concentrações de isoeugenol durante a fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 47 |
| Figura 9 - Avaliação de produção de vanilina nas diferentes concentrações de isoeugenol durante a fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633..... | 48 |
| Figura 10 - Fases observadas durante a extração do ácido ferúlico do sabugo de milho durante processo de hidrólise alcalina | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Comparação de métodos para obtenção de aromas | 17 |
| Tabela 2 - Previsão do mercado mundial de aromas e fragrâncias para 2025 | 19 |
| Tabela 3 - Principais aromas fenólicos encontrados em alimentos e bebidas e seus descritores aromáticos | 20 |
| Tabela 4 - Companhias produtoras de aroma de baunilha | 21 |
| Tabela 5 - Bioconversão de indutores para a produção de vanilina por diversos microrganismos..... | 32 |
| Tabela 6 - Composição do meio de cultura..... | 37 |
| Tabela 7 - Composição do meio fermentativo suplementado de nutrientes..... | 37 |
| Tabela 8 - Componentes da solução de oligoelementos..... | 37 |
| Tabela 9 - Avaliação do tempo de adição de isoeugenol sobre a concentração de vanilina e rendimento molar durante a fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 44 |
| Tabela 10 - Rendimento molar da produção de vanilina por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 durante a fermentação obtido em diferentes concentrações do indutor..... | 48 |
| Tabela 11 – Rendimento molar e concentração de vanilina de diferentes indutores e microrganismos..... | 49 |
| Tabela 12 - Concentração de glicose durante a fermentação de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 nas diferentes concentrações de indutor..... | 50 |
| Tabela 13 - Concentração do ácido ferúlico obtido da extração de sabugo de milho | 52 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 11 |
| 2 | OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 | Objetivo geral | 13 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 13 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 3.1 | Definição de aromas e sua classificação | 14 |
| 3.2 | Bioaromas | 15 |
| 3.2.1 | Processos de produção de bioaromas | 16 |
| 3.3 | Mercado de aromas | 18 |
| 3.3.1 | Mercado Brasileiro de aromas..... | 19 |
| 3.4 | Vanilina | 21 |
| 3.5 | Processo de obtenção da vanilina | 22 |
| 3.5.1 | Síntese natural | 22 |
| 3.5.2 | Processo sintético | 23 |
| 3.5.3 | Processo biotecnológico | 25 |
| 3.5.4 | Fatores que influenciam a produção de vanilina por via biotecnológica | 27 |
| 3.5.4.1 | <i>Fontes de carbonos</i> | 27 |
| 3.5.4.2 | <i>Idade do inoculo</i> | 30 |
| 3.5.4.3 | <i>Acidez</i> | 30 |
| 3.5.4.4 | <i>Inibição pelo produto</i> | 30 |
| 3.5.4.5 | <i>Inibição pelo indutor</i> | 31 |
| 3.5.4.6 | <i>Principais microrganismos produtores de vanilina</i> | 31 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 | Obtenção da cepa | 36 |
| 4.2 | Manutenção da cepa e indentificação morfológica | 36 |
| 4.3 | Preparo de meio para a ativação e manutenção do microrganismo | 36 |
| 4.4 | Preparo do inóculo e meio de fermentação | 37 |
| 4.5 | Avaliação da adição de isoeugenol | 38 |
| 4.5.1 | Preparo da solução de isoeugenol | 38 |
| 4.5.2 | Avaliação do tempo de adição do isoeugenol | 38 |
| 4.5.3 | Teste da adição de precursor em meio líquido em diferentes concentrações e tempos de cultivo..... | 38 |
| 4.6 | Avaliação resíduo agroindustrial como fonte alternativa de precursor 39 | 39 |
| 4.6.1 | Preparo da espiga de milho..... | 39 |
| 4.6.2 | Extração, quantificação e adição de ácido ferúlico | 39 |
| 4.7 | Métodos analíticos | 40 |
| 4.7.1 | Determinação da concentração celular | 40 |
| 4.7.2 | Determinação das concentrações de vanilina, isoeugenol e ácido ferúlico.. | 40 |
| 4.7.3 | Determinação de açúcar redutor | 41 |
| 4.8 | Metodologia de análise dos resultados | 41 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 | Análise da morfologia do microrganismo | 42 |
| 5.2 | Avaliação do indutor isoeugenol sobre a produção de vanilina | 43 |
| 5.2.1 | Avaliação do tempo de adição do isoeugenol | 43 |
| 5.2.2 | Avaliação da adição de diferentes concentrações de isoeugenol | 45 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.3 | Avaliação da adição de ácido ferúlico extraído do sabugo de milho como indutor na produção de vanilina | 50 |
| 6 | CONCLUSÃO | 54 |
| 7 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 55 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| | APÊNDICE A - Curva de crescimento do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 | 64 |
| | APÊNDICE B - Relação entre concentração de Isoeugenol e área de detecção | 64 |
| | APÊNDICE C - Curva de correlação entre a concentração de ácido ferúlico e área de detecção | 65 |
| | APÊNDICE D - Relação entre concentração de vanilina e área de detecção | 65 |
| | APÊNDICE E - Cromatograma obtido por CLAE dos padrões de vanilina e Isoeugenol | 66 |
| | APÊNDICE F - Cromatograma obtido por CLAE do padrão de ácido ferúlico | 66 |
| | APÊNDICE G - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 com adição de 5 g/L de isoeugenol em 196 horas | 67 |
| | APÊNDICE H - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 com adição de 10 g/L de isoeugenol em 196 horas | 67 |
| | APÊNDICE I - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 com adição de 15 g/L de isoeugenol em 196 horas | 68 |
| | APÊNDICE J - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 com adição de 3,4 g/L de ácido ferúlico em 196 horas | 68 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o desenvolvimento tecnológico na área de alimentos, muitos produtos entram no mercado na tentativa de agradar o paladar dos seus clientes. Dentro das diversas tecnologias que visam melhorar um produto, a adição de aditivos alimentares é uma alternativa interessante, pois pode proporcionar o aumento da durabilidade (tempo de prateleira), além de melhoria da qualidade sensorial do mesmo.

Neste sentido, os aromas, popularmente denominados como flavorizantes possuem larga aplicabilidade nos setores industriais como alimentício (bebidas, pães e massas) e farmacêutico. A vanilina, que popularmente é conhecida pelo aroma de baunilha, vem se destacando no mercado, uma vez que desempenha papel antimicrobiano e atua como intermediário para a síntese de herbicida ou até mesmo para drogas tais como papaverina, L-dopa, L-metildopa (PACHECO e DAMASIO, 2010).

Apesar da ampla utilização desse composto, esse mercado é majoritariamente dominado por aromas de baunilha quimicamente sintetizados. Contudo, os processos químicos de produção de aromas apresentam baixa ou nenhuma enantioseletividade ao substrato, resultando na mistura de produtos. Por fim, tem sido cada vez mais claro o apelo mercadológico para a substituição de produtos sintéticos por “naturais” e ingredientes mais saudáveis (VASCONCELOS, 2014). Desta forma, faz-se necessária a busca por novos processos que tornem possível a produção de aromas naturais que colaborem para contornar os problemas relacionados às transformações químicas como as condições severas de operação, o uso e potencial descarte volumoso de reagentes químicos, a baixa especificidade de reação, a alteração na percepção sensorial dos alimentos, além de eventuais problemas toxicológicos, principalmente relacionados à processos alérgicos, associados ao consumo de aromas artificiais (FELIPE, 2015).

Diante disso, considerando o contexto atual bem como a demanda por tecnologias alternativas que visam o desenvolvimento sustentável deste bioproduto, a partir da via biotecnológica pelo emprego de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) e/ou pela biossíntese, envolvendo enzimas, esta tem sido apontada como uma das tecnologias mais promissoras dentre as possíveis rotas de obtenção de aromas.

Dentre as diversas espécies de microrganismos estudadas na produção de vanilina está o *Bacillus subtilis*, o qual se destaca por apresentar alta taxa de bioconversão a partir de fontes naturais de carbono, como é o caso de resíduos de madeiras e materiais lignocelulósicos como casca de arroz, palha de trigo, casca de aveia.

Neste sentido, a obtenção de bioaromas a partir de fontes de carbono alternativas, como resíduos e subprodutos agroindustriais, como meio de cultura ou até mesmo como molécula indutora, vem sendo o foco de inúmeras pesquisas (VASCONCELOS, 2014).

Tais materiais podem ser obtidos em indústrias como a de papel e celulose ou da agroindústria como as resultantes dos resíduos provenientes de diferentes culturas, como a de milho, destacando-se a espiga de milho no oeste paranaense. Assim, o presente trabalho visou avaliar a obtenção de vanilina a partir do microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, através da adição de indutores comercial (isoeugenol) e alternativo (ácido ferúlico obtido a partir de espiga de milho). Reporta-se a inovação do presente trabalho, uma vez que não há relatos na literatura quanto à obtenção de vanilina por processo fermentativo a partir da adição de ácido ferúlico extraído de sabugo de milho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a obtenção biotecnológica da produção de vanilina a partir da utilização do microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o tempo de adição, bem como a concentração de precursor comercial (isoeugenol) na produção de vanilina;
- Avaliar o potencial do sabugo de milho na extração de ácido ferúlico;
- Avaliar o ácido ferúlico extraído do sabugo de milho como precursor alternativo ao comercial na produção de vanilina;
- Quantificar as concentrações de vanilina, isoeugenol e ácido ferúlico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e determinar o rendimento molar do processo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento de aromas requer um estudo aprofundado de novas tecnologias, tendências que proporcionam o embasamento teórico. Diante disso, nesta seção serão abordados as definições e classificação de aromas, o que são bioaromas, mercado de bioaromas, vanilina e os processos de obtenção de vanilina.

3.1 Definição de aromas e sua classificação

Os cinco sentidos humanos são tradicionalmente descritos pelo tato, visão, audição, paladar e olfato. O odor é responsável pelos compostos sentidos na via orthonasal, o aroma na via retronasal a partir da cavidade bucal quando o alimento está no interior da boca. A percepção do sabor descrita como *flavors* é a resposta integrada das substâncias voláteis aliadas as não voláteis, atribuídas aos cinco gostos básicos sendo estes, amargo, ácido, doce, salgado e umami (FELIPE, 2015).

A combinação de diferentes moléculas pode conferir uma quantidade quase infinita de notas aromáticas. O café, vinho e cerveja, por exemplo, são produtos que apresentam mais de 1000 compostos aromáticos que interagem entre si demonstrando a inesgotável possibilidade de combinações que proporciona a complexidade de um aroma. Contudo, uma única molécula determinada como “composto de impacto” pode determinar diretamente o aroma de um alimento (FELIPE, 2015).

Considerando este contexto, é importante citar que o desenvolvimento da ciência permitiu que a indústria de alimentos utilizasse de ferramentas e técnicas tanto de identificação de aromas, como por exemplo, cromatografia acoplada a espectro de massa (GC/MS), métodos de extração de compostos diretamente na natureza, para obtenção de moléculas aromatizantes, através de rotas químicas e biotecnológicas (FELIPE, 2015).

Aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias com propriedade odoríferas e ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e ou sabor dos alimentos. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico na área de alimentos, bebidas e cosméticos, os aromas assumiram a função de melhorar a aceitabilidade do produto do mercado. No caso da indústria de alimentos apesar das características nutricionais, estes são consumidos devido as propriedades organolépticas como aroma, sabor e textura (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2015).

Os aromatizantes são empregados na indústria em sua grande maioria para impedir alterações sensoriais, padronizar e/ou reconstruir o sabor dos produtos, podendo ser utilizados também, para impedir aromas e sabores indesejáveis durante o processamento de alimentos (FANI, 2011). São formados por substâncias químicas, como ésteres, ácidos, cetonas, aldeídos, álcoois e terpenos, utilizados em quantidades mínimas, que não se relacionam com o valor nutricional do alimento. Segundo a Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA, 2007) os aromas podem ser classificados com base na sua origem, conforme descrito abaixo.

- Aromas Naturais

Os naturais são obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, sendo que os métodos físicos englobam a torrefação, cocção de produtos de origem vegetal ou animal.

- Os aromas sintéticos

São produzidos exclusivamente por processos químicos. Pode-se destacar os aromatizantes idênticos ao natural que apresentam uma substância quimicamente definida obtidas por síntese e isoladas por processos químicos a partir de matérias primas de origem animal ou vegetal.

- Aromas de reação ou de transformação

São provenientes da reação de Maillard, a qual acontece na presença de um aminoácido e um açúcar redutor em uma temperatura e período não superior à 180 °C por quinze minutos (podendo ocorrer em períodos mais longos com temperatura proporcional inferior).

- Aromas de fumaça

São aromas que tem a finalidade de conferir aroma e sabor de defumado em diversos alimentos.

3.2 Bioaromas

O termo bioaroma é utilizado para designar aromas provenientes de origem fermentativa ou enzimática. Avanços recentes na biotecnologia proporcionaram diversos estudos envolvendo plantas e microrganismos, os quais, alavancaram avanços consideráveis por meio da engenharia genética, monitoramento de bioprocessos e nas técnicas de recuperação e purificação, permitindo assim, novas

oportunidades para a inserção da biotecnologia no mercado de aromas (PAROUL, 2011).

Além de serem menos agressivos ao ambiente, os processos biotecnológicos produzem aromas considerados naturais, sendo conhecido dois processos de obtenção por esta via, sendo eles a síntese *de novo* e biotransformação.

3.2.1 Processos de produção de bioaromas

Os bioaromas podem ser obtidos por dois métodos diferentes: extração natural e síntese biotecnológica (MOLINA, 2015).

A extração de compostos diretamente da natureza apresenta em sua maioria, baixo rendimento, alto custo, além da necessidade de larga extensão territorial para o plantio, destinação dos resíduos orgânicos gerados, aumento dos procedimentos de extração e purificação (FELIPE, 2015). Ademais, segundo esse autor, a extração é influenciada por diversos fatores sazonais (climáticos). E apesar destas características, os mesmos, apresentam aromas considerados de alta qualidade sensorial.

Por sua vez, a produção de aromas provenientes de vias biotecnológicas apresentam inúmeras vantagens, dentre elas pode-se citar: (i) sua obtenção ocorre em condições mais amenas de pH e temperatura, demandando menor custo energético; (ii) os processos podem ser realizados de modo contínuo e controlado não sofrendo variações sazonais associadas a disponibilidade de matéria-prima; (iii) geram produtos de maior valor agregado e; (iv) desempenham papel de melhorar a qualidade sensorial de alimentos (BICAS *et al.*, 2010 e OLIVEIRA *et al.*, 2015). Por outro lado, apesar das diversas vantagens citadas anteriormente, alguns desafios ainda devem ser superados de forma que seja possível tornar a produção em escala industrial. Entre os principais avanços que permitem uma produção mais eficaz pode-se destacar: (i) esforços na prospecção/seleção de microrganismos capazes de converterem substratos específicos para a produção aromas; (ii) estudos relacionados a otimização de processos para aumentar a concentração do produto e torná-lo um meio mais vantajoso comercialmente; (iii) conhecimento de *downstream* e *scale-up* para o aumento de escala de produção do processo (BICAS, *et al.*, 2010).

No entanto, quando se compara os bioaromas com aromas provenientes da síntese química, o alto custo está atrelado a baixa seletividade da reação, ou seja, a produção de outras moléculas químicas que danifica ou mascaram o aroma desejado. Nesta etapa, são necessárias várias operações unitárias de purificação para garantir que o aroma não tenha presença de compostos indesejáveis. Também são produzidos inúmeros resíduos químicos que necessitam também etapas de tratamento.

A Tabela 1 apresenta uma comparação dos três métodos de obtenção dos aromas.

Tabela 1 - Comparação de métodos para obtenção de aromas

| | Extração natural | Síntese química | Síntese biotecnologia |
|--------------------|--------------------------------------|---|--|
| Método | Físico | Químico | Fonte biológica |
| Rendimento | Baixo | Alto | Baixo |
| Desvantagem | Sazonalidade, e condições climáticas | Mistura de composto, baixa seletividade | Baixo conhecimento das técnicas de bioprospecção de microrganismos |
| Vantagem | Qualidade sensorial | Baixo custo | Condições brandas, processo contínuo |

Fonte: Autoria própria (2019).

Existem dois métodos de obtenção a partir da via biotecnológica, a síntese *de novo* e biotransformação.

A síntese *de novo*, palavra originária do Latim, significa “do zero, do início”. Essa rota de obtenção apresenta um produto composto de notas aromáticas provenientes de rotas metabólicas complexas partindo de um substrato simples sem adicionar indutores específicos ao meio, geralmente pode-se utilizar microrganismos como leveduras, fungos e bactérias. Este método é menos promissor visto que a concentração de aroma produzido é inferior quando comparado ao método de biotransformação, além do fato desta apresentar dificuldade no processo de *downstream*, considerando a complexidade da amostra (FELIPE, 2015 e SCHREIER, 2019).

Ainda segundo os mesmos autores, a biotransformação ocorre devido à biocatálise de precursores ou intermediários que são adicionados ao meio de cultura, sendo metabolizados por microrganismos ou células vegetais por meio da

fermentação submersa ou em estado sólido. Podem ocorrer também, na presença de enzimas, as quais aceleram as conversões do substrato no produto de interesse. Atualmente, a biotransformação tem sido amplamente descrita na literatura científica como um método bastante versátil e promissor para a obtenção de inúmeros insumos de alto valor agregado, focado principalmente na indústria de aromas e fármacos (FELIPE, 2015 e SCHREIER, 2019).

No entanto, nota-se que um dos principais desafios implementados para a biotransformação é a obtenção de linhagens de microrganismos adequados para este processo. É importante que o microrganismo seja robusto e resistente às condições do meio de cultura, bem como aos subprodutos formados durante o processo. Além disso, as linhagens devem conseguir metabolizar o substrato como sua única fonte de carbono e permitir a liberação do produto de interesse (PESSÔA, 2017).

3.3 Mercado de aromas

O mercado global de aromas foi avaliado em US\$ 13,172 milhões em 2017 e deve chegar a US\$ 20,106 milhões até 2025, tendo uma taxa de crescimento anual composta (*Compound Annual Growth Rate*– CAGR) de 5,4 % entre 2018 e 2025. Este crescimento pode ser proveniente do aumento do consumo de alimentos prontos, processados e enlatados, o que impulsiona a indústria em todo o mundo. Além disso, outros fatores, como inovação de tecnologias, introdução de novos sabores e forte fluxo de investimentos em atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação vem impulsionando o crescimento do mercado (ALLIED MARKET RESEARCH, 2018).

Uma pesquisa realizada pela *Mordor Intelligence*, verificou que, um número significativo de consumidores demonstrou interesse pela compra de produtos com etiqueta limpa, ou seja, aqueles que oferecem uma ampla gama de produtos de origem natural, o que por consequência, impulsiona a demanda de produção. Como resultado, o mercado de aromas naturais registrou a maior taxa de crescimento, representando U\$ 5,2 bilhões em 2018. Diante disso, os fabricantes estão planejando desenvolver novas e inovadoras formulações, como aromas naturais de alimentos extraídos de frutas exóticas, por exemplo (MORDER INTELLIGENCE, 2019).

O setor de aromas e fragrâncias tem diversas aplicações tais como, perfumes finos, fragrâncias de base usadas em domissanitários, cosméticos, farmacêuticos e alimentos. Estes últimos, representam não somente um mercado global

multibilionário, mas também uma fonte de desenvolvimento científico e de inovação constante, sendo os projetos de desenvolvimento de mercado da maioria das empresas secretos e confidenciais, como forma de garantir e proteger o produto (CALASANS, 2012).

As 11 maiores empresas no mundo, que comercializam aromas e fragrâncias, representaram um total de 78,6 % do mercado de aromas. As estimativas do volume de produção em milhões de dólares e as cotas de mercado de aromas e fragrâncias das maiores indústrias do mundo no ano de 2025 são apresentados na Tabela 2. Givaudan, IFF, Firmenich e Symrise dominam a maior parte do mercado, Takasago, Mane SA e Frutarom na faixa central, enquanto Sensient, Robertet AS, T. Hasegawa e Huabao Intl com cotas bastante semelhante. Os Estados Unidos, a região da Ásia/Pacífico e Europa são os maiores consumidores de fragrâncias e aromas (CALASANS, 2012 e LEFFINGWELL e ASSOCIATES, 2018).

Tabela 2 - Previsão do mercado mundial de aromas e fragrâncias para 2025

| Posição | Companhia | 2025 US\$ | Cota de mercado (%) |
|-----------------------|------------------|-----------|---------------------|
| 1º | Givaudan | 5132,8 | 19,5 |
| 2º | Firmenich | 3668,4 | 13,9 |
| 3º | IFF | 3398,7 | 12,9 |
| 4º | Symrise | 2672,6 | 10,2 |
| 5º | Mane SA | 1306,1 | 5,00 |
| 6º | Frutarom | 1271,4 | 4,80 |
| 7º | Takasago | 1185,4 | 4,50 |
| 8º | Sensient Flavors | 618,80 | 2,40 |
| 9º | Robertet AS | 570,00 | 2,20 |
| 10º | T.Hasegawa | 428,10 | 1,63 |
| 11º | Huabao Intl. | 416,20 | 1,58 |
| Total das 11 empresas | | 20.668,5 | 78,60 |

Fonte: Adaptado de LEFFINGWELL E ASSOCIATES (2018).

3.3.1 Mercado Brasileiro de aromas

Em relação ao mercado brasileiro de aromas estima-se para o período de 2020-2025 este alcance US\$ 890 milhões, com uma taxa de crescimento (CAGR) de 3,05 % durante o período de previsão (MORDOR INTELLIGENCE, 2019).

O aroma sintético detém uma participação importante no mercado, seguida dos aromas naturais. Em geral, o principal fator que influencia a decisão dos brasileiros em consumir alimentos funcionais no país são sabores, qualidade, preço e efeitos na

saúde. No entanto, os alimentos funcionais vendidos no país estão atendendo somente o requisito sabor, sendo insuficiente quanto aos demais fatores, o que pode proporcionar conseqüentemente um impulso na produção de bioaromas para se melhorar as características destes produtos (MORDOR INTELLIGENCE, 2018).

Embora o mercado de aromas brasileiros ainda não acompanhe a demanda exigida pelos consumidores, o Brasil tem grande potencial para a produção de diversos aromas provenientes das vias biotecnológicas. No entanto, ainda existe diversos gargalos e limitações na área, como por exemplo, mão de obra especializada, visto que, ainda existem poucas pesquisas acadêmicas voltada para a área de aromas, legislação lenta e obsoleta, não isonomia de condições operacionais com concorrentes internacionais, falta de linhas de crédito competitivas internacionalmente para projetos fabris viáveis e sustentáveis e quebra do paradigma: “copiar, fabricar, vender e não permitir inovar” (BENEVIDES, 2018).

Os principais aromas que vem se destacando no mercado são provenientes de compostos fenólicos, derivados de ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides (RAO e RAVISHANKAR, 2000). Na Tabela 3 são descritos os mais utilizados na indústria alimentícia.

Tabela 3 - Principais aromas fenólicos encontrados em alimentos e bebidas e seus descritores aromáticos

| Composto | Descrição dos aromas |
|-----------------|-----------------------------|
| 4-Vinilfenol | Amêndoas, medicinal |
| 4-Vinilguaiacol | curral, cravo |
| 4-Etilguaiacol | picante, cravo |
| Isoeugenol | floral |
| Vanilina | baunilha, doce |
| Ácido vanílico | baunilha |

Fonte: Flavornet (2021).

O aroma de baunilha é um dos aromatizantes mais apreciados no mundo e um importante flavorizante para alimentos, bebidas, além de ser utilizado em alguns produtos farmacêuticos. O extrato natural de baunilha é uma mistura complexa de aromas extraído das vagens de duas espécies diferentes de orquídeas (*Vanilla planifolia* e *Vanilla tahitensis*), com aproximadamente 200 compostos em seu perfil aromático, como vanilina, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzoico e álcool 4- hidroxibenzílico (RAO e RAVISHANKAR, 2000).

A vanilina é o aroma que possui uma demanda de aproximadamente 20.000 toneladas por ano, sendo considerado um dos aromatizantes mais apreciados no mundo (RUBERT, *et al.*, 2016).

3.4 Vanilina

Esta é popularmente denominado de baunilha e cientificamente de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, sendo o terceiro aroma mais caro do mundo, após o açafraão e o cardamomo (LOPES, 2018).

O extrato natural de vanilina custa cerca de US\$ 1.200 a US\$ 4.000/kg, o sintético US\$ 15/kg. Já o aroma obtido por forma biotecnológica aproximadamente US\$ 1.000/kg (GALAGE e MOLLER, 2015). O mercado de baunilha é dominado por 9 empresas (Tabela 4) que exportam para diversas regiões do mundo. No caso do Brasil, a produção é extremamente baixa e não existem dados estatísticos oficiais de sua produção (RAMACHANDRA e RAVISHANKA, 2000).

Tabela 4 - Companhias produtoras de aroma de baunilha

| Empresa | Cidade - País |
|--------------------------------------|----------------------|
| ESC Agenetics Corporation | California - USA |
| David Michael Co Inc | Filadélfia - USA |
| Nielsen-Massey Vanillas Inc | Waukegan, IL - USA |
| Premier Vanilla Inc | Brunswick - USA |
| Virginia Dare | Brooklyn - US |
| Gernot Katzer | USA |
| Aust and Hachmann Ltd | Montreal – CA |
| Food Research and Development Centre | Quebec – CA |
| Haarmann and Reimer (H&R), | Holzminden - DE |

Fonte: Adaptada de RAMACHANDRA E RAVISHANKA, (2000)

Este aroma possui uma ampla gama de aplicações, sendo aproximadamente, 60 % destinado à indústria de alimentos, 33 % como fragrância na indústria de perfumes e cosméticos e 7 % na indústria química e farmacêutica. Na indústria de alimentos é usada principalmente como aroma de baunilha, na indústria química, como intermediário na síntese de vários produtos como o veratraldeído, o aldeído protocatecuico, e seus respectivos ácidos, e na indústria de farmacêutica como precursor na fabricação de drogas antimutagênico e antioxidante (DAUGSCH PASTORE, 2005 e OLIVEIRA, 2015).

Historicamente, a produção de vanilina foi obtida a partir da sua extração direto da vagem das plantas *Vanilla planifolia* e *Vanilla tahitensis* (fazendo delas as únicas orquídeas com interesse comercial fora do contexto ornamental). O aroma extraído da *Vanilla planifolia* é conhecido por possuir a melhor qualidade (Bourbon), sendo destinado para preparações alimentares como sorvetes, bolos, chocolates e bebidas. Os aromas extraídos da *Vanilla tahitensis* (Sul do Pacífico), *Vanilla java* (Indonésia) e *Vanilla pompana* (Antilhas) são utilizados em tabacos, sabonetes, perfumes e medicamentos (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016).

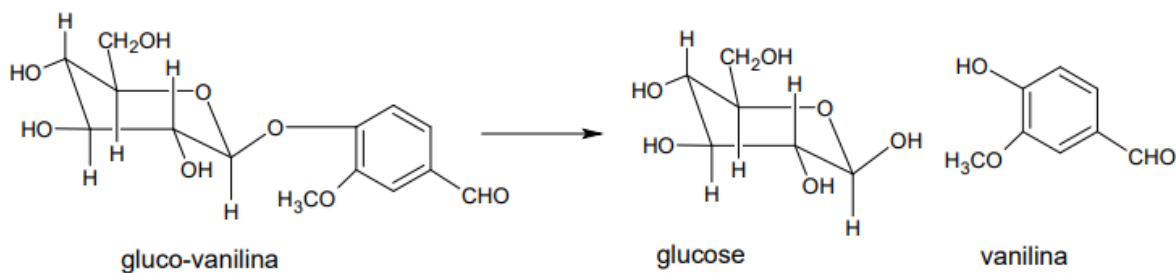
3.5 Processo de obtenção da vanilina

Assim, como exposto anteriormente na sessão 3.2.1 a produção de vanilina também pode ser realizada pelos três métodos, conforme está descrito abaixo.

3.5.1 Síntese natural

A produção natural é realizada por meio da colheita e maturação das vagens da orquídea *Vanilla planifolia*. A vanilina permanece armazenada na forma de gluco-vanilina, sendo que, nestas condições não possui o aroma característico de baunilha. No entanto, após o processo de maturação, que envolve umidificação e secagem das vagens, a gluco-vanilina é hidrolisada pela enzima vanilina- β -D-glucosidase em glucose e vanilina como demonstra a Figura 1. O conteúdo de vanilina extraído por esse processo é de aproximadamente 2,5 % em massa (DAMASIO e PACHECO, 2010).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da hidrólise enzimática de gluco-vanilina em glicose e vanilina



Fonte: Adaptado de DAMASIO e PACHECO (2010).

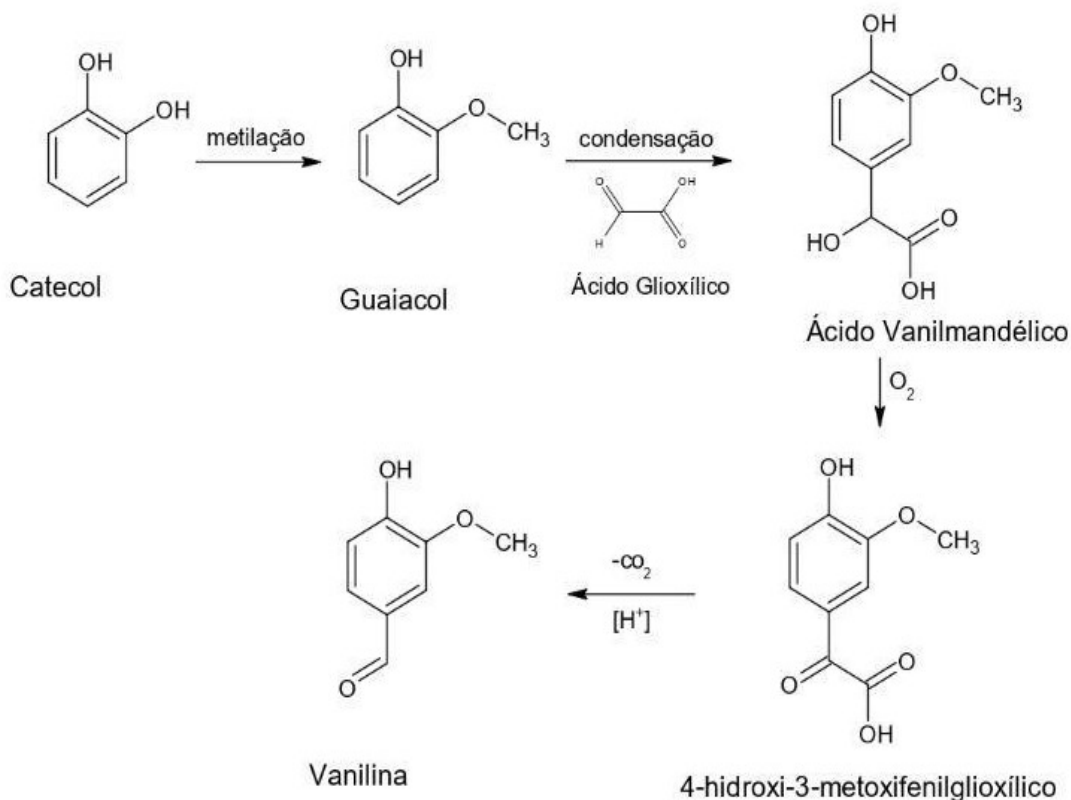
A vanilina natural também pode ser obtida mediante um processo de extração com etanol (60 % m/v) em temperaturas brandas, sendo este considerado vantajoso em relação ao processo por extração com fluidos quentes, em que as vagens são adicionadas sobre grades situadas em tanques de aço, nos quais o solvente é recirculado por um período de aproximadamente duas semanas (DAMASIO e PACHECO, 2010). Assim, este último processo é reportado como lento, de baixo rendimento e de custo elevado, sendo necessários cerca de 500 kg de vagem de baunilha para produzir 1 kg de vanilina (DAMASIO e PACHECO, 2010). Desta forma, para satisfazer as necessidades do mercado, novos estudos são destinados a obter vias alternativas de produção (OLIVEIRA, 2015).

3.5.2 Processo sintético

A vanilina obtida por processo sintético não possui diferença em relação à vanilina natural. A maior parte da vanilina comercial é sintetizada a partir do guaiacol, o qual pode ser obtido a partir do catecol ou do ortonitroclorobenzeno, sendo o restante produzido a partir de licores sulfíticos residuais oriundos da indústria de papel e celulose (BOUDEVIN *et al.*, 2015 e DAMASIO e PACHECO, 2010). No caso da produção de vanilina a partir de catecol, o processo mais interessante para a sua síntese, inicia-se pela condensação do guaiacol com ácido glioxílico formando ácido vanilmandélico, que por sua vez é oxidado a ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilglioxílico. Posteriormente, há uma descarboxilação deste ácido formando vanilina, conforme é

apresentado na Figura 2. O produto comercial é, então, obtido por destilação a vácuo e posterior recristalização (BICAS *et al.*, 2017; BOUTEVIN *et al.*, 2015 e DAMASIO e PACHECO, 2010).

Figura 2 - Compostos petroquímicos convertidos a vanilina



Fonte: Adaptado de FELIPE e BICAS, (2017).

Já na produção de vanilina a partir de ortonitroclorobenzeno, a condensação do guaiacol com urotropina, ocorre na presença de *N,N*-imetil-4-nitrosoanilina, seguida por hidrólise, permitindo sintetizar a vanilina. Este processo apresenta como desvantagem a quantidade de impurezas presentes, sendo que, algumas ainda não foram totalmente identificadas, desconhecendo-se assim seus possíveis efeitos sobre o ser humano e o meio ambiente (DAMASIO e PACHECO, 2010).

Com relação à obtenção a partir de licores sulfíticos provenientes da indústria de celulose, destaca-se a lignina presente como matéria-prima principal. Para isso, o licor concentrado é tratado com álcalis em altas temperaturas e pressões, na presença de oxidantes, o que resulta na formação de vanilina. Posteriormente, esta

é separada de subprodutos por extração, destilação e cristalização. No entanto, este processo apresenta um grave problema de disponibilidade, visto que os processos envolvendo a produção de papel apresentam menor taxa residual de licor tornando esta matéria-prima mais escassa. Além disso, o processo de produção de papel é acompanhado de 160 toneladas de soda cáustica provocando alto grau de impacto na qualidade do aroma a ser obtido, além do impacto ambiental (DAMASIO e PACHECO, 2010).

3.5.3 Processo biotecnológico

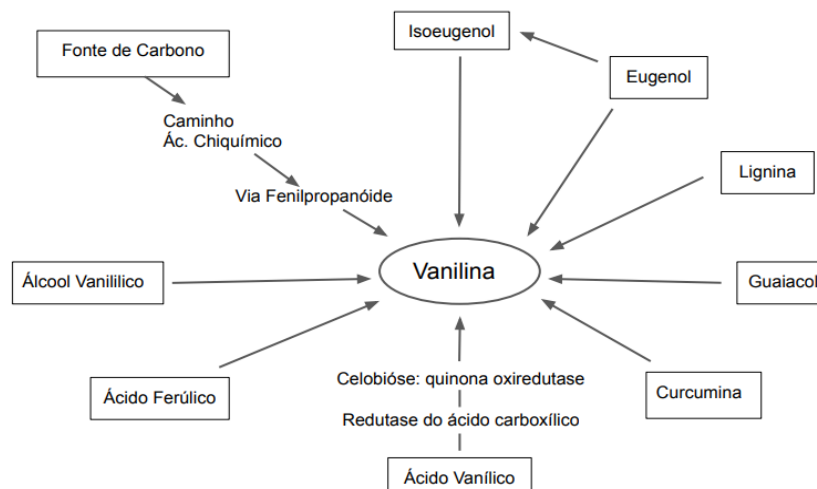
A vanilina proveniente de vias biotecnológicas pode ser produzida a partir de fontes sintéticas de carbono, resíduos da agroindústria ou até mesmo utilizando extratos enzimáticos. Pode-se ainda empregar culturas de células imobilizadas, células em repouso (*resting cells*) ou sistemas multifásicos (fase aquosa contendo biocatalisador e fase orgânica contendo substratos/produtos) (FELIPE, 2017).

Para a síntese e conversão do substrato em vanilina torna-se necessário conhecer melhor os microrganismos, bem como as vias metabólicas envolvidas nos processos fermentativos, de forma a permitir que as transformações ocorram em condições mais brandas, que permitam o acúmulo no meio reacional do produto de interesse e que não apresente compostos intermediários com características tóxicas ao microrganismo (LABUDA, 2018).

A maioria dos processos microbianos ou enzimáticos encontrados na literatura que envolvem a produção de vanilina, utilizaram junto ao meio de cultura precursores que aumentaram significativamente a sua concentração, dentre estes, pode-se citar: lignina, curcumina, estilbenos fenólicos, isoeugenol, eugenol, ácido ferúlico, aminoácidos aromáticos e fontes de carbono via biossíntese *de novo* (Figura 3).

Destaca-se a biotransformação do ácido ferúlico, isoeugenol, eugenol, por serem os mais utilizados e prontamente disponíveis em diversos resíduos, além de que, apresentam um custo de extração inferior quando comparados aos demais indutores (RAMACHANDRA e REVISCHANKAR, 2000). Segundo Labuda (2008) muitos fungos e bactérias têm a capacidade de metabolizar os precursores acima mencionados, porém algumas das vias metabólicas microbianas foram elucidadas com a ajuda da engenharia genética.

Figura 3 - Vias microbianas de obtenção de vanilina



Fonte: Adaptado de LABUNA (2018).

Dentre os compostos apresentados, um dos precursores mais atraentes para a obtenção biotecnológica de vanilina é o ácido ferúlico, pois podem ser encontrados em grãos, madeiras, gramíneas, frutas, vegetais e resíduos agrícolas. Dentre estas últimas fontes, destacam-se a polpa de beterraba sacarina, farelo de arroz, espiga de milho, farelo de trigo ou o farelo de milho proveniente da indústria cervejeira (LABUDA, 2018).

O ácido ferúlico proveniente da parede celular de plantas, possui fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$ e estão ligados como ésteres de polissacarídeos, flavonoides, amidas, lipídios e álcoois de cadeia longa. Este composto se apresenta como um pó amarelo pálido (Chemical Book, 2019) e pode ser utilizado como antineoplásico, colerético, conservante alimentar, antioxidante, anti-inflamatório e potencializador de filtro solar. Sua massa molar é de 194,18 g/mol e é relativamente insolúvel ($0,8 \text{ gL}^{-1}$) em água a pH inferior a 9,0. O pH mais alto auxilia na biotransformação, uma vez que os compostos fenólicos tendem a oxidar em um pH alto (VASCONCELOS, 2014).

Para a liberação do ácido ferúlico e do ácido *p*-cumárico em solução, tem-se a quebra das ligações ésteres com o auxílio da hidrólise alcalina ou ácida, ambas são realizadas em temperaturas altas ($85 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$). A espiga de milho, por exemplo, ao realizar a hidrólise alcalina libera em solução de 1 a 9 gL^{-1} de ácido ferúlico e $2,1 \text{ g/L}$ de ácido *p*-cumárico (LABUDA, 2018).

Com relação ao eugenol (4-alil-2-metosifenol), este é um composto fenólico presente em alguns óleos essenciais, como no caso do cravo da Índia que é composto por 88 % de eugenol, pode se apresentar como um líquido incolor, amarelo pálido, claro ou de cor âmbar, com um odor de cravo e sabor picante (CHEMICAL BOOK, 2019). Não apresenta solubilidade em água, é um composto químico com densidade de 1,065 g/cm³ na temperatura de 20-25 °C, massa molar de 164,21 g/mol e fórmula molecular C₁₀H₁₂O₂, com uso geral em perfumaria e processos de produção de vanilina (VASCONCELOS, 2014).

Já o isoeugenol tem fórmula molecular C₁₀H₁₂O₂ e massa molar 164,2 g/mol é geralmente preparado a partir do eugenol pela via química (CHEMICAL BOOK, 2019). A isomerização do eugenol em isoeugenol é catalisada por íons metálicos a temperatura elevada em hidróxido de potássio (KOH). Este apresenta-se como um líquido viscoso amarelo-esverdeado com densidade de 1,082 g/mL a 25 °C, estável e incompatível com agentes oxidantes fortes. É ligeiramente solúvel em água e é um produto químico combustível (LABUDA, 2018).

Em trabalhos previamente realizados por Lessage-Messen (2002) e Oddou *et al.* (1999), foi constatado que as fontes de carbono celobiose, glicose, frutose e maltose associadas ao ácido ferúlico, eugenol ou outro precursor influenciaram a produção de vanilina por via biotecnológica durante a bioconversão de *Pycnoporus cinnabarinus*. Segundo Labuda (2018), os açúcares como fonte de carbono desempenham três papéis importantes durante a formação da vanilina: (i) como fonte de energia para o organismo produtor; (ii) como precursor da vanilina; (iii) como um co-fator.

3.5.4 Fatores que influenciam a produção de vanilina por via biotecnológica

3.5.4.1 Fontes de carbonos

As fontes de carbono utilizadas na produção de aromas têm função tanto de auxiliar na indução, como dar suporte para o desenvolvimento celular. Nem todos microrganismos conseguem converter os açúcares em vanilina como a glicose, frutose, glucose, aminoácidos, celulose e diversos subprodutos e/ou resíduos provenientes da agroindústria, como por exemplo, compostos derivados da espiga de

milho, melaço de cana, licor negro e farelo de soja. Diante disso é necessário metaboliza-los juntamente com os indutores que são adicionados no meio de cultura (JUN *et al.*, 2015).

A glicose e frutose são os principais açúcares de muitas frutas, como uva, maçã, laranja, pêsego, possuem fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e conseguem ser metabolizadas por vários microrganismos, além de que, para a biossíntese de vanilina é uma alternativa barata e de fácil acesso (ODDOU, J. *et al.*, 1999). Diversos mecanismos estão descritos na literatura que demonstram a conversão da glicose em vanilina. No entanto, segundo Jun *et al.* (2015) em sua grande maioria o processo de obtenção da vanilina é menor sem a presença do indutor.

O uso de resíduos agroindustriais em processos envolvendo organismos vivos tem se mostrado como uma oportunidade para o desenvolvimento de uma economia sustentável, uma vez que, baseia-se na utilização de recursos renováveis para a substituição de fontes de carbono (CORREIA, 2015).

Nesse contexto, investimentos públicos e privados têm financiado atividades de pesquisa e desenvolvimento nessa área, sendo cada vez mais difundido o uso de biomassas de origem vegetal. Estas apresentam grande potencial para substituir os recursos fósseis como matérias-primas industriais, agregando valor comercial à estas que em alguns casos são descartadas de forma irregular e ao mesmo tempo, o seu uso pode resultar na obtenção de biocombustíveis, produtos químicos e materiais, impulsionando os setores energético e não energéticos, como a indústria química, têxtil e alimentícia (BARROS, 2011).

Estas matérias-primas têm potencial de aproveitamento, devido à sua composição, uma vez que é rica em celulose e hemicelulose, as quais podem ser reaproveitadas economicamente. Esses materiais renováveis são fornecidos por quatro diferentes setores: agricultura (produtos e resíduos agropecuários); silvicultura (produtos e resíduos florestais); indústria (resíduos e sobras de processos) e aquicultura (algas e microalgas) (BARROS, 2011; CORREIA, 2015).

Um das matérias-primas oriundas da agroindústria é a palha e a espiga de milho, ambos são destinados à incineração ou usadas como leitos nos criadouros de aves nas propriedades rurais brasileiras, sendo um material abundante em celulose, porém pouco aproveitado de forma a gerar renda.

O sabugo de milho representa cerca de 20 % (m/m) do peso da espiga seca. Considerando que a estimativa de produção global, na safra de 2019/2020 foi de 250,5 milhões de toneladas de milho, produzindo assim 50 milhões de toneladas de espiga de milho (CONAB, 2020). Uma grande quantidade de espigas de milho permanece sem uso como resíduo lignocelulósico ou como ração animal. Tal matéria-prima contém 31,7 % de celulose, 34,7 % de hemicelulose, 20,3 % de lignina e 3,4 % de grupos acetil grupos (RIVAS *et al.*, 2002).

Estes dados demonstram que a espiga de milho é um material abundante sendo também de fácil obtenção. Além de apresentarem uma ótima alternativa para a utilização como fonte de carbono, a espiga de milho apresenta uma concentração alta do indutor ácido ferúlico, que pode ser usado como um metabólico de conversão para a síntese da vanilina (ROMÃO, 2015).

Outro resíduo rico em celulose é o licor negro, resíduo proveniente da indústria de papel. O licor negro possui conteúdo de sólidos dissolvidos e uma grande diversidade de substâncias químicas oriundas da degradação de lignina (fenóis de baixa e alta massa molar e de toxicidade reconhecida) e polissacarídeo. Este atualmente é convertido em vanilina através de síntese química, onde são adicionadas soda cáustica (ARAÚJO, 2008). No entanto, podem ser utilizados microrganismos capazes de metabolizar os compostos e convertê-los em vanilina, conforme reportado por Araújo, (2008).

Na fabricação de açúcar, o melaço é um dos subprodutos mais abundantes, sendo produzido na proporção de 40 a 60 Kg/toneladas de cana processada. Trata-se de um líquido viscoso, rico em sacarose que além de possuir vitaminas e minerais, tais como, nitrogênio, fosfatos, cálcio, magnésio, zinco, manganês, carbono, cobre e ferro essenciais para a fermentação, é considerado um substrato de baixo custo comercial e de fácil obtenção. Diversos trabalhos encontrados na literatura também descrevem o emprego de melaço para a produção de diferentes aromas (CORREIA, 2015).

Assim, a reutilização de fontes provenientes da agroindústria, como por exemplo, a espiga de milho, o licor negro e o melaço de cana, são possibilidades de redução dos custos de obtenção de vanilina por via biotecnológica, além de ser uma alternativa de reaproveitar e agregar valor aos subprodutos e/ou resíduos deste setor.

3.5.4.2 Idade do inoculo

Outro fator que é reportado refere-se à idade do inóculo, uma vez que para maximizar o rendimento da bioconversão, o microrganismo deve estar adaptado ao substrato tanto quanto possível (RIVAS *et al.*, 2009). Para atingir este resultado, o inóculo deve ser realizado após o microrganismo ter completado sua fase de crescimento exponencial e antes de entrar na fase estacionária. Em estudos reportados por Torre *et al.*, (2004) ao avaliar *E. coli* JM109 (pBB1) eles mostraram que a biomassa dessa cepa em condições de não proliferação (*células em repouso*) pode ser reciclada até 4 vezes sem perda significativa da capacidade de bioconversão, podendo assim, ser utilizada em um processo contínuo com a imobilização das células em material esponjoso sintético.

3.5.4.3 Acidez

O nível de acidez é um dos parâmetros que mais influência tanto na bioconversão do substrato em vanilina como no crescimento celular. Desta forma, os microrganismos que conseguem produzir vanilina atuam em pH acima de 7,4. Em pH mais ácido bioconversão do substrato diminui em relação ao pH básico (CONVERTI, *et al.*, 2010).

3.5.4.4 Inibição pelo produto

Quando o acúmulo do produto final de uma via bioquímica interrompe a síntese do produto desejado, ocorre a inibição pelo produto. A produção de vanilina por microrganismos está associada à formação de vários compostos, como o ácido vanílico e o álcool vanílico, que podem atuar, juntamente com a vanilina, como potenciais inibidores do crescimento celular e da via metabólica (CONVERTI, *et al.*, 2010).

3.5.4.5 *Inibição pelo indutor*

Alguns compostos fenólicos, como por exemplo, eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico, quando adicionados na fase de adaptação do microrganismo no meio de cultura, acabam atuando com ação inibitórias nas células microbianas. Esse fato foi reportado por Converti *et al.* (1986) e também por Zhang *et al.* (2006). Em seus estudos, Converti *et al.* (1986) eles descrevem que um aumento progressivo na concentração de ácido ferúlico no início da fermentação reduz a produtividade específica da vanilina. Isso ocorre de uma forma semelhante à observada para o excesso de inibição do substrato da fermentação alcoólica. Para Zhang *et al.* (2006) o uso do isoeugenol diretamente no início do crescimento celular proporciona autólise das células microbianas provocando a morte celular.

3.5.4.6 *Principais microrganismos produtores de vanilina*

Diversos microrganismos encontrados na literatura têm potencial para a produção de vanilina e verifica-se que esta produção depende não só da espécie dos microrganismos, como também do indutor utilizado, conforme está apresentado na Tabela 5. Assim, a Tabela 5 apresenta os principais microrganismos que têm potencial para tal aplicação, o indutor utilizado, bem como a concentração de vanilina encontrada no meio fermentativo (BELLO, 2013).

Tabela 5 - Bioconversão de indutores para a produção de vanilina por diversos microrganismos

| Microrganismo | Indutor | Produção (g/L) | Referência |
|--|----------------|----------------|-----------------------------------|
| <i>Streptomyces setonii</i> ATCC 39116 | Ácido ferúlico | 13,9 | (MÜLLER., 1998) |
| <i>E. coli</i> BW25113 (pTAHEF) | Ácido ferúlico | 5,14 | (LEE <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>E. coli</i> strain JM109/pBB1 | Ácido ferúlico | 2,52 | (BARGHINI <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Bacillus fusiformis</i> SW-B9 | Ácido ferúlico | 32,5 | (ZHAO <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Pseudomonas putida</i> IE27 | Isoeugenol | 16,1 | (YAMADA, 2007) |
| <i>Bacillus subtilis</i> HS8 | Isoeugenol | 8,10 | (ZHANG <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Bacillus pumilus</i> S-1 | Isoeugenol | 3,75 | (HUA <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Pseudomonas sp.</i> THR199 | Isoeugenol | 0,44 | (OVERHAGE <i>et al.</i> , 1999) |
| <i>Pseudomonas sp.</i> TK2102 | Eugenol | 0,28 | (WASHISU <i>et al.</i> , 1993) |
| <i>P. resinovorans</i> SPR1 | Eugenol | 0,24 | (ASHENGROPH <i>et al.</i> , 2011) |

Fonte: Adaptada de BELLO, (2013)

Abaixo destaca-se os principais microrganismos produtores de vanilina por via biotecnológica.

- *Streptomyces sp.*

O microrganismo *Streptomyces setonii* é uma cepa que fornece um dos maiores rendimentos de vanilina (BELLO, 2013). Foi identificado por Sutherland *et al.* (1983) e de acordo com seus subprodutos formados (álcool vanílico, ácido vanílico, guaiacol, 4-vinilguaiacol e 2-metoxi-4-etil-fenol) foi possível elaborar uma via metabólica que descreve a conversão do ácido ferúlico em vanilina. A reação inicia com a conversão do ácido ferúlico através da isomerização enzimática formando o intermediário quinoide, que subsequente sofre descarboxilação dando origem ao composto 4-vinilguaiacol (LABUDA, 2018).

De acordo com a literatura, os resultados da bioconversão do indutor em vanilina dependem fortemente do pH do meio, sendo o pH básico (8,2), mostrou-se ideal para o acúmulo de vanilina, alcançando rendimento de bioconversão de 90 % (PALMQVIST e GUNNARSSON, 2006). Segundo os mesmos autores, o pH mais ácido favoreceu a redução da vanilina em álcool vanílico. Ainda segundo o mesmo estudo verificou-se a influência do indutor e da fonte de carbono na produção de

vanilina, pois quando se utilizou ácido ferúlico, obteve-se uma produção de 13,1 g/L em comparação ao meio contendo somente glicose (9,2 g/L) ou arabinose ((4,7 g/L).

- *Bacillus sp.*

Os *Bacillus spp.* degradam uma ampla gama de ácidos aromáticos como por exemplo, ácidos cinâmico, 4-cumárico, 3-fenilpropionico, 3-(p-hidroxifenil) propionico, ferúlico, benzóico e 4-hidroxibenzóico. Podem também metabolizar tanto o ácido ferúlico quanto o isoeugenol. O ácido ferúlico é metabolizado através de um mecanismo não oxidativo e produz os intermediários ácido 4-hidroxi-3-metoxifenil- β -hidroxipropionico, vanilina e ácido vanílico. Por outro lado, o isoeugenol pode ser metabolizado por uma via de epóxido-diol (LABUNA, 2018).

Um estudo realizado por Karmakar *et al.* (2000), verificou que *Bacillus coagulans BK07* converteu o ácido ferúlico dentro de 7 horas para 4-vinilguaiacol, que foi imediatamente convertido em vanilina e depois oxidado em ácido vanílico.

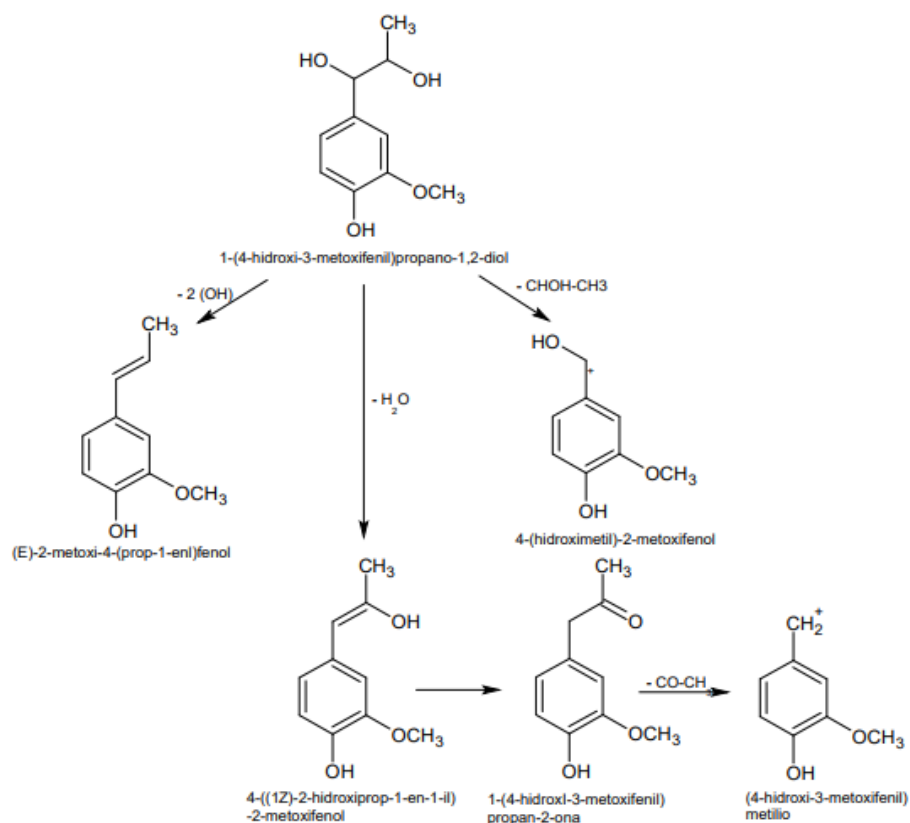
Também há relatos de que *Bacillus subtilis* isolado do solo é capaz de crescer com isoeugenol como única fonte de carbono e convertê-lo em vanilina (SHIMONI *et al.*, 2000). Segundo estes autores, a bioconversão foi alcançada utilizando as células livres, ou até mesmo, o extrato fermentativo livre de células, sendo que *B. subtilis* produziu 0,61 g/L de vanilina, enquanto extratos livres de células produziam 0,9 g/L de vanilina a partir de isoeugenol.

Gurujeyalakshmi e Mahadevan (1987) *apud* Vasconcelos (2014) reportaram um estudo com *B. subtilis*, isolada do solo nativo de floresta e cultivada em meio de cultura contendo lignina como fonte de carbono. Segundo estes autores o microrganismo foi cultivado com diferentes indutores, sendo eles, vanilina, ácido vanílico e ácido protocatecúrico separadamente e de acordo com os resultados, verificou-se que o microrganismo avaliado foi capaz de utilizar todos os indutores para a produção de vanilina (GURUJEYALAKSHMI e MAHADEVAN, 1987 e VASCONCELOS, 2014).

Outros estudos realizados por Zhang e Han, (2006) com uma linhagem de *B. subtilis* isolada do solo e cultivada em meio Luria Bertani (LB) observaram a capacidade deste em converter isoeugenol a vanilina. De acordo com o trabalho, a concentração de 10 g/L de isoeugenol resultou na produção de 1,36 g/L de vanilina

após 96 horas de fermentação. Este trabalho também propôs uma provável via de biotransformação do isoeugenol a vanilina como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Provável rota de formação de vanilina por *Bacillus subtilis* a partir de isoeugenol



Fonte: ZHANG e HAN (2006).

- *Pseudomonas sp.*

As *Pseudomonas spp.* possuem um metabolismo versátil e conseguem metabolizar diferentes fontes de carbono e indutores, como por exemplo, compostos fenólicos incluindo eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico ou até mesmo vanilina (LABUDA, 2018).

Sob condições de reação otimizadas, as células *P. putida* IE27 produziram 16,1 g/L de vanilina a partir de isoeugenol 150 mM com um rendimento de conversão molar de 71 % a 20 °C após 24 horas. Já o rendimento de bioconversão quando utilizado ácido ferúlico foi de 20 % (DI GIOIA *et al.*, 2011).

A vanilina demonstrou ser ainda mais oxidada a partir do emprego do ácido vanílico e do ácido protocatecólico em *Pseudomonas sp.* que expressa um conjunto completo de genes (*vdh*, *vanA/vanB*, *pcaG/pcaH*) necessários para esse metabolismo (DI GIOIA *et al.*, 2011).

Overhage *et al.* (1999) em seu trabalho utilizando uma mutante de *Pseudomonas sp.* cultivada em meio contendo eugenol como única fonte de carbono, mostraram uma via de degradação por meio de uma β -oxidação da cadeia lateral de ácido ferúlico.

Outro trabalho reportado na literatura utilizando *E. coli* envolveu o estudo com duas cepas que foram geneticamente construídas com o objetivo de utilizar eugenol como substrato de bioconversão (OVERHAGE, *et al.*, 1999). Segundo esses autores, as cepas foram desenvolvidas em duas etapas: a) transformação genética inserindo os genes *calA* e *calK* que tem como objetivo converter o eugenol em ácido ferúlico; b) inserção dos genes que codificam a feruloil-CoA, sintetase (*fcs*) e enoil-CoA hidratase/aldolase (*ech*) de *Pseudomonas sp.*, que codificam a enzima responsável pela conversão do ácido ferúlico em vanilina. Estas duas cepas quando cultivadas em conjunto após 30 horas produziram cerca de 0,3 g/L de vanilina, 0,1 g/L de ácido vanílico e 4,6 g/L de ácido ferúlico, tendo um rendimento de bioconversão de 91 %.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta sessão serão apresentados os procedimentos, bem como, as metodologias empregadas para a realização do presente trabalho.

4.1 Obtenção da cepa

A cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi gentilmente doada pela professora Dra. Adriana Fiorini, a qual é docente da Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina. A cultura inicialmente foi mantida e repicada em tubos de ensaio contendo meio caldo meio Luria Bertani (g/L): triptona (10,0); extrato de levedura (5,0); cloreto de sódio (5,0) e depois conservada a 4 °C (Hua *et al.*, 2007).

4.2 Manutenção da cepa e indentificação morfológica

Para a manutenção e avaliação do microrganismo deste estudo, o mesmo foi repicado em três placas de Petri contendo meio Mueller Hinton, sendo incubado a 35 °C por 24 horas (LABORCLIN, 2019). As placas de Petri foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) do setor Palotina/PR para a verificação em microscopia óptica (marca Likon) da morfologia do microrganismo.

Para facilitar a identificação da morfologia realizou-se uma coloração de Gram (PELCZAR, *et al.*, 1993).

4.3 Preparo de meio para a ativação e manutenção do microrganismo

Alçadas do microrganismo foram transferidas em quantidade significativa para um meio de cultura líquido descrito na Tabela 6. O cultivo foi realizado em frascos agitados a 120 rpm, 35 °C por cerca de 24 horas sendo que após este período, ao conteúdo foi acrescido glicerol (PA) à 10 % (v/v) e armazenado em microtubos à temperatura de -20 °C (MELLO, 2001).

Tabela 6 - Composição do meio de cultura

| Nutrientes | Quantidade (g/L) |
|---------------------|-------------------------|
| Extrato de carne | 1,0 |
| Glicose | 10,0 |
| Extrato de levedura | 2,0 |
| Peptona | 5,0 |
| Cloreto de sódio | 5,0 |

Fonte: MELLO (2001).

4.4 Preparo do inóculo e meio de fermentação

4.4.1 Preparo do inóculo

Uma alíquota de 2,0 mL de células de *Bacillus subtilis* previamente estocada em freezer, conforme descrito na sessão 4.3, foi transferida em condições assépticas para frascos Erlenmeyer contendo cerca de 23 mL de meio de cultivo conforme descrito nas Tabelas 7 e 8, a fim de se completar 25 mL de meio de fermentação. Os frascos foram dispostos em incubadora de movimento rotatório (marca Thoth) com agitação de 125 rpm, a 35 °C por 24 horas (ZHANG, *et al.*, 2006).

Tabela 7 - Composição do meio fermentativo suplementado de nutrientes

| Nutrientes | Quantidade (g/L) |
|---|-------------------------|
| Glicose | 10 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2,0 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0,2 |
| K ₂ HPO ₄ | 14 |
| Solução oligoelementos* | 10 ml/L |

Fonte: Adaptado de CARVALHO *et al.* (2010)

*Preparado conforme descrição na Tabela 8.

Tabela 8 - Componentes da solução de oligoelementos

| Nutrientes | Quantidade (g) |
|--------------------------------------|-----------------------|
| CaCl ₂ | 0,42 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 2,29 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,10 |
| ZnCl ₂ | 0,17 |
| CuCl ₂ | 0,03 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,06 |
| Volume da solução | 1000 mL |

Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.* (2010).

4.4.2 Meio e condições de fermentações

Os experimentos e condições para a fermentação foram realizados empregando-se os mesmos meios descritos nas Tabelas 7 e 8, conforme apresentado na sessão 4.4.1 com exceção dos indutores. Para os cultivos foram adicionados cerca de 5% (v/v) de inóculo correspondente ao meio fermentativo, cujo volume foi de 25 mL (CARVALHO *et al.*, 2010). O tempo de fermentação variou em função do estudo relativo ao tempo e concentração de adição isoeugenol aos meios, conforme apresentado na sessão 4.5.

4.5 Avaliação da adição de isoeugenol

4.5.1 Preparo da solução de isoeugenol

Preparou-se a solução estoque diluindo-se o isoeugenol da marca Merk em etanol P.A com 99 % de pureza a uma concentração de 50 g/L (VASCONCELOS 2014).

4.5.2 Avaliação do tempo de adição do isoeugenol

Com base em estudos realizados por Zhang, *et al.* (2006), experimentos preliminares foram realizados para avaliar o tempo de adição do isoeugenol. Para isso, isoeugenol a 10 g/L foram adicionados nos tempos 0 (M1) e 24 horas após o início da fermentação (M2). Os experimentos foram realizados em triplicada e as amostras retiradas nos tempos 0, 24, 48, 96, e 144 horas para a determinação da concentração de vanilina.

4.5.3 Teste da adição de precursor em meio líquido em diferentes concentrações e tempos de cultivo

Após determinado o tempo de adição do isoeugenol, o microrganismo foi cultivado em diferentes concentrações do indutor 5,0; 10, 15 g/L. Concentrações estas que foram baseadas no trabalho de Vasconcelos (2014). Os experimentos

foram realizados em triplicata e cerca de 25 mL de amostras foram retiradas nos tempos zero, 96, 144 e 196 horas para a determinação da concentração celular, concentração de vanilina, concentração de glicose e de indutor (VASCOLCELOS, 2014).

4.6 Avaliação resíduo agroindustrial como fonte alternativa de precursor

Após a determinação da melhor condição de obtenção de vanilina no processo fermentativo via indutor comercial, foi avaliado o potencial do ácido ferúlico extraído da espiga de milho como alternativa a este precursor.

4.6.1 Preparo da espiga de milho

As espigas de milho (híbrido B2688PWU) foram pré-tratadas seguindo a metodologia descrita por Torre *et al.* (2008). Inicialmente realizou-se a fragmentação da espiga de milho em moinho de facas, em seguida, a estas foram acrescidas de solução de NaOH (2 molL^{-1}) na proporção de 0,084 g de sabugo de milho/g de solução. A reação ocorreu por 6 horas em temperatura ambiente em frascos agitados a 120 rpm. Após a hidrólise, as amostras foram centrifugadas á 1344 rcf (força centrífuga relativa) por 20 minutos e o sobrenadante destinado para a extração do ácido ferúlico. O pH do sobrenadante foi ajustado para 3,0 usando HCl 2 mol/L

4.6.2 Extração, quantificação e adição de ácido ferúlico

A extração foi realizada em tubos de centrífuga de 15 mL, adicionando-se surfactante (Triton X-100) no sobrenadante obtido na sessão 4.6.1 na concentração de 5 % (v/v). Esta solução foi misturada vigorosamente e mantida em banho-maria fervente por 5 min. Em seguida, realizou-se centrifugação a 6804 rcf por 5 min, o que resultou na separação das fases aquosa, orgânica e de material precipitado (DHAMOLE, DEMANNA e DESAI, 2014). Posteriormente, as amostras (fase aquosa e orgânica) foram encaminhadas para a determinação da concentração de ácido ferúlico presentes nas amostras.

As fermentações contendo a adição de ácido ferúlico como precursor na produção de vanilina foram realizadas nas mesmas condições de cultivo conforme descrito na sessão 4.5.3, com exceção da adição de precursor comercial.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por espectrofotometria a 600 nm, onde a concentração de células em g/L foi calculada por uma curva padrão que correlaciona a absorbância a 600 nm e o peso seco das células obtidas do cultivo por 24 horas após o preparo do inóculo, conforme está apresentado no Apêndice A (VASCONSELOS, 2014).

4.7.2 Determinação das concentrações de vanilina, isoeugenol e ácido ferúlico

4.7.2.1 *Preparo das amostras provenientes do meio fermentativo*

As amostras provenientes do meio fermentativo foram centrifugadas a 756 rcf por 10 minutos para a separação das células. Com o sobrenadante coletou-se 1 ml e completou-se com 10 mL de metanol/água (1:1 v/v). Em seguida, as amostras foram filtradas em um filtro de seringa fluoreto de polivinilideno pvdf 0,45 µm e encaminhadas para a análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.7.2.2 *Metodologia de análise por CLAE*

A análise por CLAE foi realizada em um cromatógrafo da marca Thermo Fisher com detector de UV-vis com coluna C18 (Promosil - 5 µm, 250 mm × 4.6 mm). O volume de injeção foi de 20 µL, o fluxo correspondeu a uma taxa constante de 1 mL/min, e as amostras foram monitoradas a 280 nanômetros a 30°C. A fase móvel foi composta de água:acético a 0,3 % (v/v) com pH de 3,0 (denominado solvente A) e o solvente B por metanol 90 % (v/v), 9 % (v/v) de água e 1 % (v/v) de ácido acético. As condições iniciais empregadas foram de 95 % (v/v) de A e 5 % (v/v) de B. Um

gradiente linear de solvente B foi usado: de 5 a 44 % (v/v) por 30 minutos, posteriormente o gradiente foi ajustado para 44 a 95 % (v/v) por 10 minutos, e em seguida retornou-se às condições iniciais em 10 minutos (tempo total de execução 50 min) (Adaptada de Torre *et al.*, 2008).

Os padrões analíticos ácido ferúlico (Sigma-Aldrich) e vanilina (Sigma-Aldrich) foram fornecidos pelo Laboratório multiusuário da UTFPR-TD, e o isoeugenol foi adquirido com recurso de edital PROPPG 07/2020 - Programa de Apoio à Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico (PAPCDT). Para cada padrão foi construído uma curva analítica de concentração versus área do pico, a qual está apresentada nos apêndices B, C e D. Os respectivos cromatogramas exemplificando o tempo de retenção de cada padrão está apresentado no apêndice E e F. Já os cromatogramas referentes ao tempo final de fermentação (196 horas) encontram-se nos apêndices G, H, I e J.

4.7.3 Determinação de açúcar redutor

A metodologia de determinação de açúcar foi baseada em Miller (1959). Inicialmente preparou-se a solução de DNS. Posteriormente foi realizado uma curva padrão de correlação entre a concentração de glicose nas concentrações crescentes (g/L) de: 3.0; 2.5; 2.0; 1.0; 0.5 e 0.1 e a absorbância obtida em 540 nanômetros. Este processo foi realizado para cada um dos padrões. Para a análise dos meios fermentativos, seguiu-se com o mesmo procedimento, no entanto, em vez da glicose substituiu-se pelas amostras nos diferentes tempos de cultivo do meio fermentado.

4.8 Metodologia de análise dos resultados

O rendimento do processo de obtenção da vanilina foi realizado com base na bioconversão do indutor, como demonstra a equação 1 (VASCONCELOS, 2014).

$$\text{Rendimento} = \frac{(C \text{ vanilina})}{(C \text{ indutor})} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

C vanilina = concentração da vanilina (mol/L);

C indutor = concentração do indutor (mol/L).

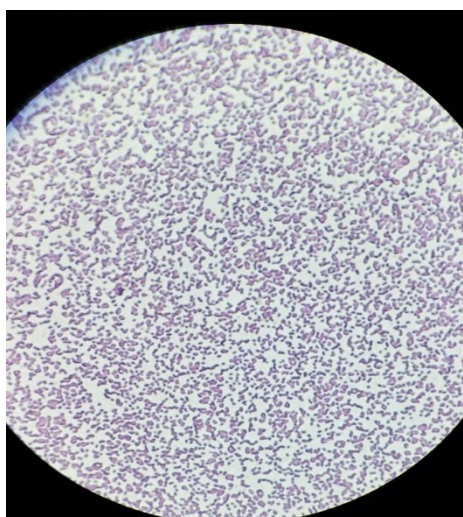
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta sessão serão abordados os principais resultados obtidos, dentro deles, pode-se destacar a análise da morfologia do microrganismo, avaliação do tempo de adição do isoeugenol, bem como a adição de diferentes concentrações e a influência destes parâmetros no bioprocesso em questão. Será abordado também, sobre a extração de ácido ferúlico de sabugo de milho e seu potencial para a produção de vanilina.

5.1 Análise da morfologia do microrganismo

A fim de se avaliar a morfologia da cepa a ser estudada, análise de coloração de Gram e visualizações microscópicas foram realizadas, conforme é apresentado na Figura 5. Segundo a literatura, o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 é uma bactéria não patogênica para seres humanos, é muito utilizada para fins biotecnológicos industriais na produção de antibióticos e produtos agroativos. São bactérias autóctones do solo, do tipo Gram positivas, aeróbias facultativas, não fotossintetizantes e com maior atividade em temperaturas de 25 a 35 °C, portanto são bactérias mesófilas (PELCZAR *et al.*, 1981).

Figura 5 - Coloração de gram do microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Fonte: Autoria própria, (2021).

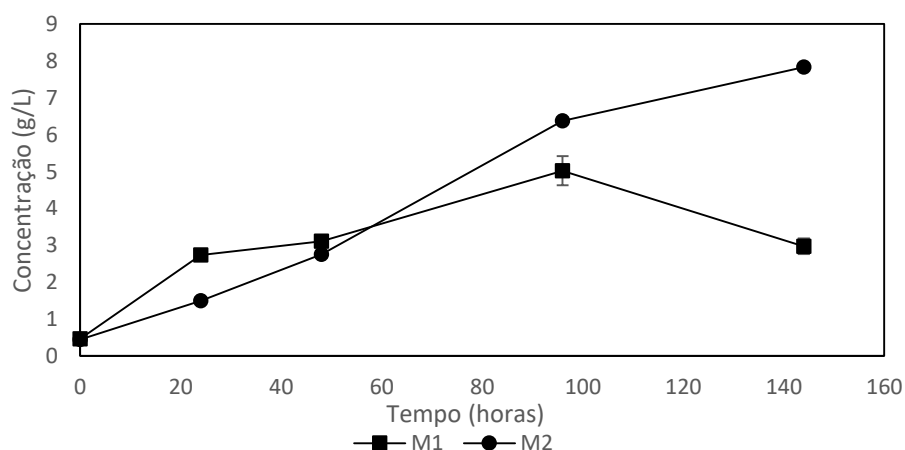
A coloração de Gram permite identificar dois grandes grupos de microrganismos Gram-positivas, as quais coram-se de roxo e gram-negativas que se coram de rosa. Essas bactérias reagem de modo diferente a coloração de Gram, devido às diferenças estruturais presentes em suas paredes celulares (PEREIRA, PETRECHEN, 2011). Sua principal vantagem é identificar a morfologia dos microrganismos presentes, além disso, possíveis contaminações que possam estar presentes nos cultivos. Conforme é apresentado na Figura 5, nota-se que a morfologia encontrada se refere à forma de bastonetes e a coloração Gram positiva, conforme está reportado na literatura. Além disso, é possível verificar ainda nesta figura a predominância de uma cultura pura.

5.2 Avaliação do indutor isoeugenol sobre a produção de vanilina

5.2.1 Avaliação do tempo de adição do isoeugenol

Para se avaliar a influência do isoeugenol como precursor na produção de vanilina, experimentos preliminares foram realizados a fim de se avaliar a concentração deste no início da fermentação, ou seja, no tempo zero horas (M1) e após 24 horas de cultivo (M2). A Figura 6 a Tabela 9 apresentam os resultados destes experimentos iniciais sobre o crescimento celular e a concentração de vanilina, respectivamente.

Figura 6 - Avaliação do tempo de adição de isoeugenol sobre a concentração celular durante a fermentação por *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Fonte: Autoria própria, (2021).

Tabela 9 - Avaliação do tempo de adição de isoeugenol sobre a concentração de vanilina e rendimento molar durante a fermentação por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

| Tempo (h) | Vanilina formada em M1 (g/L) | Rendimento molar (%) - M1 | Vanilina formada em M2 (g/L) | Rendimento molar (%) - M2 |
|-----------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 0 | 0,000 | - | 0,000 | - |
| 24 | 0,072 ± 0,625 | 0,776 | 0,050 ± 0,725 | 0,539 |
| 48 | 0,149 ± 0,078 | 1,61 | 0,180 ± 0,883 | 1,94 |
| 96 | 0,304 ± 0,226 | 3,28 | 0,349 ± 0,750 | 3,76 |
| 144 | 0,459 ± 0,980 | 4,94 | 0,510 ± 0,855 | 5,50 |

Fonte: Autoria própria, (2021).

De acordo com os resultados, notou-se que no experimento no qual a adição de isoeugenol ocorreu logo no início do processo fermentativo (M1) o crescimento celular apresentou um declínio após 96 horas de cultivo, indicando possivelmente morte celular. Tal fato não foi observado no experimento ao qual este precursor foi adicionado após 24h (M2), uma vez que nesta condição verifica-se uma reta quase constante, ou seja, um crescimento exponencial foi observado ao longo de todo o cultivo. Tais comportamentos corroboram com os estudos reportados por Zhang *et al.* (2006) e Ashengroph *et al.* (2011), uma vez que segundo estes autores a adição de isoeugenol no início do crescimento celular apresenta toxicidade para as células microbianas proporcionando autólise das células, induzindo-as a morte celular. Segundos os mesmos autores são aconselháveis que o indutor seja adicionado na fase estacionária de crescimento celular, a qual, as células já apresentam robustez e adaptabilidade ao meio de cultura.

Com relação ao tempo de adição do indutor sobre a concentração de vanilina (Tabela 9), verificou-se que o cultivo M2, semelhante ao observado para a concentração celular, também favoreceu a bioconversão em vanilina. O rendimento molar alcançado foi de 5,5 % para a condição M2 e 4,9 % para M1. Valores de rendimentos semelhantes foram relatados por Zhão *et al.* (2005), no qual os autores encontraram um rendimento molar máximo de 5,8 % em 72 horas, com 60 % (v/v) de indutor no meio de fermentativo. Adição esta que foi 42 % maior do que empregado neste trabalho.

Ainda de acordo com esses autores, como as etapas bioquímicas não estavam bem elucidadas, ainda existia uma grande necessidade de otimizar os parâmetros

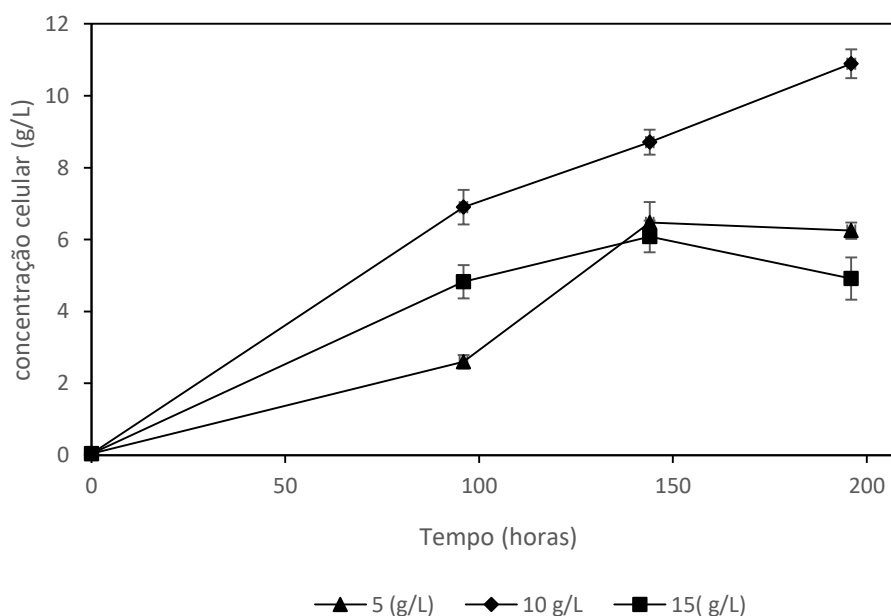
que mais influência no processo fermentativo, e a partir dele, tornar a produção de vanilina mais rentável.

Assim, verificou-se que a concentração de vanilina nos tempos 48, 96 e 144 horas na condição M2 foi de 17,2 %, 12,89 % e 10,0 % maior em relação a condição M1, respectivamente. Deste modo, notou-se que a adição do isoeugenol após 24 horas de cultivo proporcionou os melhores resultados referente a obtenção de vanilina, bem como crescimento celular.

5.2.2 Avaliação da adição de diferentes concentrações de isoeugenol

Após o estabelecimento do tempo de adição de isoeugenol ao bioprocessamento, avaliou-se a adição de diferentes concentrações deste ao meio de cultivo. Assim, as Figuras 7, 8 e 9 apresentam os perfis cinéticos referente às concentrações de células, isoeugenol e vanilina, respectivamente em relação às diferentes concentrações de isoeugenol.

Figura 7 - Avaliação do crescimento celular pela adição de diferentes concentrações de isoeugenol durante a fermentação por *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Fonte: Autoria própria, (2021).

De acordo com a Figura 7, observa-se que houve um aumento da concentração celular em até 144 horas de cultivo, independentemente da concentração de isoeugenol adicionada. Porém, após este período, observou-se que

para a adição as concentrações de 5 g/L e 15 g/L houve uma estabilização e queda da concentração de células, respectivamente. Com relação ao comportamento observado para a adição de 5 g/L de isougenol, tal fato pode ser compreendido uma vez que segundo Vasconcelos (2014), a baixa concentração do indutor (após 144 horas) pode resultar uma estabilização da concentração celular. Este comportamento corrobora com os resultados obtidos, uma vez que ao final da fermentação (144h), nesta condição observou-se apenas 1,96 g/L de isoeugenol (Figura 8).

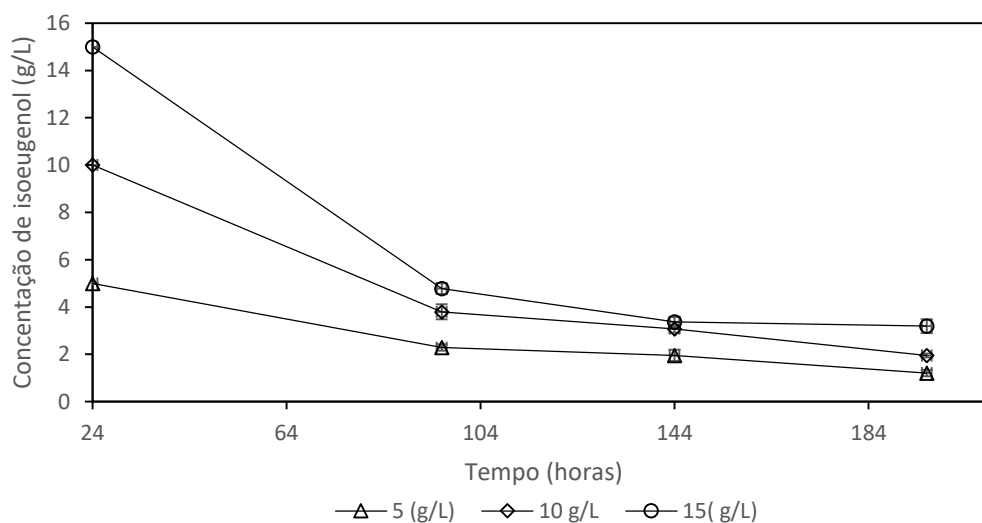
Já com relação à adição do indutor na concentração de 15 g/L, foi possível notar uma inibição no crescimento do celular, a qual possivelmente foi proveniente da toxicidade do isoeugenol às células microbianas ou até mesmo a fraca dispersibilidade do indutor no meio fermentativo, conforme previamente reportado por Ashengroph *et al.* (2010).

Por outro lado, o isoeugenol na concentração de 10 g/L não proporcionou inibição no crescimento do microrganismo resultando nesta condição em maiores concentrações celulares (10,89 g/L) em 196 horas. Esses resultados também estão de acordo com dados reportados por Vasconcelos (2014), no qual o autor avaliou a produção de biomassa de uma espécie diferente *A. orientalis* com a concentração de isoeugenol de 1 a 10 g/L, ele pode perceber que o isoeugenol em até 10 g/L favoreceu a formação de biomassa $0,594 \text{ g/L} \pm 0,017$ em 48 horas.

Diante disso, verificou-se a capacidade que o microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 apresentou em crescer em diferentes concentrações de isoeugenol e transformar o substrato em vanilina, desempenho este que pode ser explicado pela indução destes compostos para a produção de enzimas que são capazes de degradar tais substâncias. Esse comportamento está de acordo com estudos realizados por Fleige *et al.* (2012) que ao investigar o microrganismo *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 puderam notar a presença de uma enzima, que é responsável por realizar a desidrogenase da vanilina, que foi expressa por um gene correspondente pela indução de isoeugenol. Esses autores também notaram que essa mesma enzima não estava presente na solução quando não se tinha a presença do indutor.

Já na Figura 8, nota-se que houve uma rápida diminuição da concentração de isoeugenol em até 96 horas de cultivo, em todas as concentrações do indutor utilizada. No entanto, acima deste tempo, observou-se uma estabilização do consumo de isoeugenol.

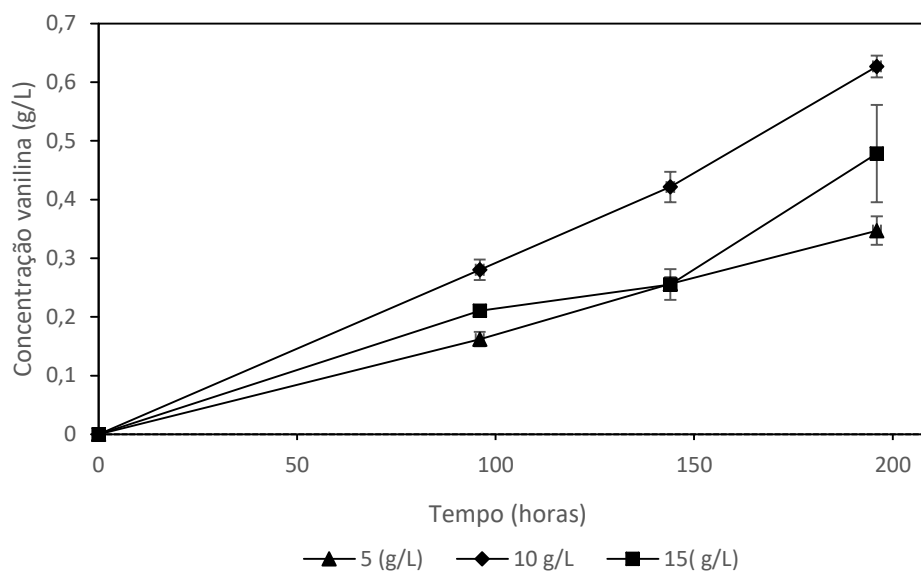
Figura 8 - Avaliação do consumo de diferentes concentrações de isoeugenol durante a fermentação por *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Fonte: Autoria própria, (2021).

Esse decréscimo significativo da concentração de isoeugenol nas primeiras 96 horas de cultivo, pode indicar que, no primeiro momento o isoeugenol foi direcionado para a conversão em fontes de carbono e manutenção celular, conforme previamente observado por Vasconcelos, (2014). No momento em que ocorre a estabilização do consumo de isoeugenol, tem-se o aumento da produção de vanilina conforme demonstra a Figura 9. Nota-se também que no final do período de estabilização (196 horas) a taxa de rendimento molar (%) é o dobro do que nas primeiras 96 horas (Tabela 10).

Figura 9 - Avaliação de produção de vanilina nas diferentes concentrações de isoeugenol durante a fermentação por *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Fonte: Autoria própria, (2021).

Tabela 10 - Rendimento molar da produção de vanilina por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 durante a fermentação obtido em diferentes concentrações do indutor

| Tempo (horas) | Rendimento molar (%) | | |
|---------------|----------------------|--------|--------|
| | 5 g/L | 10 g/L | 15 g/L |
| 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 96 | 3,50 | 3,02 | 1,51 |
| 144 | 5,52 | 4,54 | 1,83 |
| 196 | 7,48 | 6,76 | 3,44 |

Fonte: Autoria própria, (2021).

Durante este bioprocessamento a máxima concentração de vanilina foi de $0,62 \pm 0,018$ g/L sendo alcançada em 196 horas na concentração de 10 g/L de isoeugenol, resultando em um rendimento molar de 6,76 % (Tabela 10). Já a concentração de vanilina em 196 horas para as concentrações de 5 e 15 g/L, foram de $0,34$ g/L $\pm 0,024$ e $0,47 \pm 0,083$ g/L, o que correspondeu às conversões molares de 7,48 % e 3,44 %, respectivamente.

Ainda de acordo com a Tabela 10, nota-se que quando da adição da menor concentração de isoeugenol (5 g/L), o rendimento molar após 196 horas foi o mais alto em comparação às demais concentrações avaliadas, podendo-se observar que

com o aumento da concentração deste indutor, o rendimento molar foi reduzido. Assim, pode ser verificado uma relação inversamente proporcional entre a concentração do precursor e a eficiência molar na bioconversão de isoeugenol a vanilina para esta bactéria.

Ao se comparar os dados obtidos no presente trabalho com os dados reportados na literatura relativos à produção de vanilina (Tabela 11), verificou-se que os valores encontrados são superiores aos apresentados nos trabalhos de Vasconcelos (2014) que avaliou o mesmo microrganismo e Li *et al.* (2008) que avaliou outro microrganismo e indutor. No entanto, Shimoni *et al.* (2000) e Zhang *et al.* (2006) encontraram valores superiores empregando-se a mesma espécie.

Tabela 11 – Rendimento molar e concentração de vanilina de diferentes indutores e microrganismos

| Indutor | Microrganismo empregado | Rendimento molar (%) | Concentração de vanilina (g/L) | Referência |
|-------------------------|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Isoeugenol (5 g/L) | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 7,48 | 0,340 | Presente trabalho |
| Isoeugenol (10 g/L) | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 6,76 | 0,620 | Presente trabalho |
| Isoeugenol (15 g/L) | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 3,44 | 0,470 | Presente trabalho |
| Isoeugenol (10 g/L) | <i>A. orientalis</i> | 5,04 | 0,470 | Vasconcelos (2014) |
| Isoeugenol (10 g/L) | <i>B. subtilis</i> | 2,37 | 0,220 | Vasconcelos (2014) |
| Isoeugenol (10 g/L) | M1 (cepa isolada do solo) | 1,25 | 0,130 | Vasconcelos (2014) |
| Isoeugenol (10 g/L) | M3 (cepa isolada do solo) | 2,82 | 0,260 | Vasconcelos (2014) |
| Ácido ferúlico (1g/L) | <i>Enterobacter</i> sp Px6-4 | 2,18 | 0,017 | Li <i>et al.</i> (2008) |
| Isoeugenol (8,8g/L) | <i>Bacillus subtilis</i> | 12,4 | 0,620 | Shimoni <i>et al.</i> (2000) |
| Isoeugenol (10 g/L) | <i>Bacillus subtilis</i> HS8 | 14,7 | 1,340 | Zhang <i>et al.</i> (2006) |
| Ácido ferúlico (1 g/L) | <i>E. coli</i> | 9,00 | 1,100 | Yoon, <i>et al.</i> (2005) |
| Ácido ferúlico (20 g/L) | <i>Amycolatopsis</i> sp. HR167 | 77,8 | 11,50 | Rabenhorst <i>et al.</i> (2003) |

Fonte: Autoria própria, (2021).

Vasconcelos (2014) obteve um rendimento molar de 5,01 %, 2,37 %, 1,25 % e 2,82 % concentração de vanilina de 0,47 g/L, 0,22 g/L, 0,130 g/L, 0,260 g/L para as cepas de *A. orientalis*, *B. subtilis*, M1, M2 e M3 respectivamente. Já Li *et al.* (2008) detectaram uma concentração de 0,0172 g/L de vanilina formada pela conversão de ácido ferúlico após 108 horas de fermentação por *Enterobacter* sp. Px6-4 isolada da vanilla, valores estes inferiores aos obtidos neste trabalho. Por outro lado, Yoon *et al.* (2005) descreve em seus trabalhos a obtenção de 1,1 g/L de vanilina após 48 horas de fermentação por *E. coli* transformada geneticamente a partir de ácido ferúlico e Zhang *et al.* (2006) ao utilizar *B. subtilis* H28 alcançou uma produção de 1,36 g/L e uma taxa de eficiência molar de 14,6 %, valores estes superiores aos alcançados neste trabalho.

De uma forma em geral, verifica-se que o baixo rendimento na produção de vanilina pode ser proveniente da preferência que o microrganismo teve em utilizar o isoeugenol como fonte de carbono para o crescimento e manutenção celular, uma vez que, praticamente todo o açúcar já havia sido consumido às 96 horas de cultivo, conforme demonstra a Tabela 12.

Tabela 12 - Concentração de glicose durante a fermentação de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nas diferentes concentrações de indutor

| Tempo (horas) | Concentração de glicose em 5 g/L | Concentração de glicose em 10 g/L | Concentração de glicose em 15 g/L |
|---------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 0 | 10,7 | 10,7 | 12,0 |
| 96 | 0,120 | 0,127 | 0,106 |
| 144 | 0,150 | 0,138 | 0,095 |
| 196 | 0,155 | 0,152 | 0,144 |

Fonte: Autoria própria, (2021).

5.3 Avaliação da adição de ácido ferúlico extraído do sabugo de milho como indutor na produção de vanilina

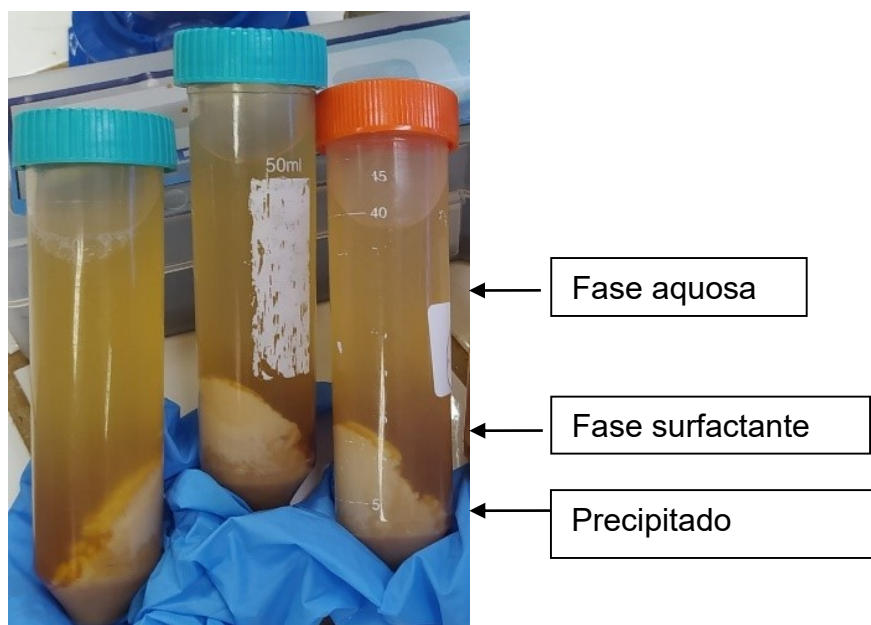
A hidrólise alcalina é uma técnica empregada para degradação do material lignocelulósica, sendo o uso de condições mais suaves necessário para otimizar a

liberação de ácidos fenólicos ligados a éster para possível biotransformação em vanilina (LAWTHER *et al.*, 1996) (RUAN *et al.*, 2004).

De acordo com a literatura, diferentes álcalis, como NaOH, Ca(OH)₂, NH₄OH e H₂O₂ são frequentemente utilizado como catalisadores. Entre estes, o hidróxido de sódio (NaOH) foi selecionado neste trabalho, porque, apesar de ser relativamente baixo o rendimento de designificação em estudos mostrados por Vazquez e Cervantes (1994), este mostrou-se mais seletivo na liberação de compostos fenólicos como os ácidos *p*-cumárico e ferúlico.

A hidrólise alcalina seguida da extração com surfactante é um método relativamente novo e é chamado de extração do ponto de nuvem. Essa extração é baseada no uso de surfactante para a separação de duas fases aquosas. Os surfactantes são anfifílicos, isto é, eles têm partes hidrofóbicas e hidrofílicas. O grupo hidrofílico (iônico ou altamente polar) determina a solubilidade do surfactante em água (Xu *et al.*, 2005). Diante disso, durante a extração do sabugo de milho foram obtidas três fases: a fase aquosa, a fase contendo surfactante, e ainda, material precipitado, conforme pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Fases observadas durante a extração do ácido ferúlico do sabugo de milho durante processo de hidrólise alcalina



Fonte: Autoria própria, (2021).

Segundo Dhamole, Demanna e Desai, (2014) a eficiência de extração do ácido ferúlico está associada diretamente a hidrofobicidade e a solubilidade do surfactante. Assim, surfactantes que apresentam em sua composição grandes cadeias hidrofóbicas são capazes de aumentar a extração dos compostos fenólicos, o Triton X-100, por exemplo, apresenta 9,5 grupos de óxido de etileno (grupos hidrofílicos), o que proporciona uma grande interação entre os grupos hidrofóbicos com os componentes hidroxila dos compostos fenólicos (DHAMOLE, DEMANNA e DESAI, 2014). Segundo estes autores em pH baixo (1,0 a 3,0), o ácido ferúlico aparece da forma não ionizada e, portanto, dificultam a interação com a água, forçando-a a entrar na fase micelar. Já em pH mais alto (>5,0), o ácido ferúlico está presente na forma ionizada proporcionando maior interação com água, aumentando a sua afinidade em direção a fase aquosa, resultado assim, em menor rendimento de extração. Na Tabela 13 é possível observar o rendimento da extração do ácido ferúlico nas três fases de extração.

Tabela 13 - Concentração do ácido ferúlico obtido da extração de sabugo de milho

| | Concentrações de Ácido Ferúlico (g/L) |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Fase rica em surfactante | 3,40 |
| Fase precipitada | 1,82 |
| Fase aquosa | 0,36 |

Fonte: Autoria própria, (2021).

O teor de ácido ferúlico obtido na fase rica em surfactante foi de 3,4 g/L sendo 46,47 % e 89,41 % maior que no material precipitado e na fase aquosa, respectivamente. Esses resultados foram 64,7 % e 69 % maior do que os testes realizados por Torre *et al.* (2008) e por Dhamole, Demanna e Desai, (2014), indicando assim um grande potencial para a utilização de sabugo de milho como fonte em potencial de ácido ferúlico e seu potencial como precursores para a produção de vanilina.

Após a extração do ácido ferúlico, avaliou-se então a sua adição como alternativa de precursor visando à produção de vanilina. Escolheu-se a adição do ácido presente na fase surfactante a qual correspondeu à máxima concentração (3,401 g/L), bem como esta era a mais próxima à verificada como que resultou nos melhores resultados quando da utilização de indutor comercial.

De acordo com os resultados encontrados, não se verificou formação de células, bem como produção de vanilina nesta condição.

Possivelmente, houve a inibição do microrganismo em função da concentração adicionada ao meio de fermentação, uma vez que segundo Vasconcelos (2014) que avaliou a cepa de *Bacillus subtilis* MLPB em meio MS modificado, acrescido de 1 a 5 g/L de ácido ferúlico, não apresentou qualquer crescimento. Um outro estudo realizado por Peng, *et al.* (2016) verificaram que *B. subtilis* pode crescer e converter ácido ferúlico em vanilina quando a concentração deste ácido estava entre 0,2-0,8 g/L. No entanto, quando a concentração deste foi superior a 0,8 g/L, a capacidade de conversão foi reduzida. Ainda de acordo com estes autores, quando a concentração de ácido ferúlico foi 1,3 g/L, a taxa de conversão à vanilina por *B. subtilis* atingiu o menor valor, por outro lado, valores de 0,2 g/L de ácido ferúlico, resultaram em taxa de conversão elevada. Assim, estes autores concluíram que a bactéria não poderia crescer em um meio com alta concentração de ácido ferúlico, pois o indutor apresentou efeito inibitório sobre o crescimento celular. Assim, verifica-se que a adição de 3,4 g/L de ácido ferúlico extraído do sabugo de milho, ao meio de fermentação afetou negativamente o crescimento de *B. subtilis*, conseqüentemente a produção de vanilina.

Uma possível outra explicação para o não crescimento celular, refere-se a de que o ácido ferúlico pode ser rapidamente oxidado em guaiacol e ácido vanílico, na presença do surfactante, o que pode também ter afetado a necessidade que o microrganismo apresentou em converter estas fontes de carbono (KAUR; CHAKRABORTY, 2013). Além disso, segundo estudos reportados por Potumarthi *et al.* (2007), o aumento da concentração de ácido ferúlico (superior a 1,5 g/L) também pode ocasionar um aumento na viscosidade do meio de fermentação, o que por sua vez influencia negativamente a transferência de massa volumétrica de oxigênio, resultando em menor rendimento na produção de enzimas. Assim, baixas taxas de produção de enzimas levariam a uma biotransformação enzimática limitada, o que impede a biotransformação do indutor em vanilina.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, verificou-se que o melhor tempo de adição do isoeugenol ocorreu após 24 horas de cultivo, proporcionando um aumento na concentração de biomassa celular. Com relação à adição de diferentes concentrações deste indutor, constatou-se que a máxima produção de vanilina (0,62 g/L), ocorreu na presença de 10 g/L em 196 horas de fermentação, o que, não correspondeu ao máximo rendimento molar que ocorreu quando da adição de 5 g/L (7,48 %).

Verificou-se o potencial da extração de ácido ferúlico a partir de sabugo de milho, uma vez que foi encontrada concentração de 3,4 g/L deste composto, valor este superior aos reportados na literatura. No entanto, acredita-se que esta concentração pode ter levado à inibição do crescimento celular afetando negativamente a bioconversão, uma vez que, não se observou a formação de vanilina.

Assim, a continuidade das pesquisas com alcance de uma tecnologia alternativa à produção de vanilina deve ser baseada em pesquisas que contemplem a avaliação da adição de concentrações menores de ácido ferúlico extraído do sabugo de milho, bem como outras metodologias de extração do mesmo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função deste trabalho ter sido o primeiro nesta linha de pesquisa, sugere-se a avaliação de parâmetros como, pH do meio, concentrações iniciais de fontes de carbono e células e combinações de concentrações de diferentes indutores ao meio de cultivo. Além disso, realizar novos estudos a fim de se avaliar menores concentrações tanto do indutor comercial (isoeugenol), bem como do ácido ferúlico extraído do sabugo de milho visando aumentar o rendimento molar. Também se reporta a necessidade em se realizar uma fermentação com ácido ferúlico (PA) comercial, a fim de se avaliar a produção de vanilina no meio de fermentação, bem como a possível oxidação do ácido ferúlico obtido do sabugo de milho, observada neste trabalho ocorreu em função da interação deste com o surfactante empregado.

Sugere-se também a avaliação por CLAE de metabólitos subsequentes do metabolismo do *Bacillus subtilis*, como os ácidos vanílico, e guiacol que demonstram a sequência da rota bioquímica de biotransformação do ácido ferúlico a vanilina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W.R.; ARFMANN, H.A.; STUMPF, B.; WASHAUSEN, P.; KIESLICH, K. Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds. **Bioflavour '87**, p. 399-414, 31 dez. 1988. DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/9783110867121-029>

ADITIVOS E INGREDIENTES. Vanilina um aroma com múltiplas aplicações. **Aditivos e Ingredientes**, 2016. Disponível em <https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201603/2016030918856001459186774.pdf>. Acessado em 24 de agosto de 2021.

ANTOINE, C.; PEYRON, S.; MABILLE, F.; LAPIERRE, C.; BOUCHET, B.; ABECASSIS J.; ROUAU. X. Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 2026-2033, mar. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf0261598>.

ANVISA. Regulamento Técnico sobre aditivos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2007. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/alimentos/aditivos-alimentares>>. Acessado em 24 de agosto de 2021.

ARAÚJO, J. D. P. **Production of vanillin from lignin present in the Kraft black liquor of the pulp and paper industry**. 2008. 372 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de engenharia, Universidade do Porto. Ciudad del Porto, 2008. Disponível em <<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/11944/2/Texto%20integral.pdf>>. Acessado em 24 de agosto de 2021.

ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; ESTEHANI, Z. H.; MOMENBEIK, F. **Use of growing cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the natural vanillin via conversion of isoeugenol**. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813051/>>. Acessado em 21 de julho de 2021.

ASHENGROPH, M.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. Optimization of media composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomonas sp.* strain KOB10 using the Taguchi method. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 6, p. 339-347, set./dez. 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.3109/10242422.2010.530660>

BARROS, F. F. C. **Obtenção de compostos de aroma, enzimas e biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em manipueira**. 2011. 129 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BELLO, E. D. **Vanillin production from ferulic acid with *Pseudomonas fluorescens* BF13-1p4**. Università di Bologna. Itália. 2013. Disponível em <http://amsdottorato.unibo.it/5482/1/PhD_Thesis_EDB.pdf>. Acessado em 24 de agosto de 2021.

BENEVIDES, P. Tecnologia e processos extração e transformação. *In: Workshop em bioeconomia*, 2008, Campinas. Disponível em: <http://www.agropolocampinasbrasil.org/arquivos/7_workshop_bioeconomia/6_Benevides_CTA.pdf>. Acessado em 07 de Outubro de 2019.

BICAS, J. L, *et al.* Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, mar. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000100002>.

BOUDEVIN, B.; FECHE, M.; CAILLOL, S. Vanillin, a key intermediate of biobased polymers. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 488–502, jul. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.050>.

CALASANS, P. N. **Produção de aroma de coco por *Trichoderma harzianum* utilizando bagaço de cana**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2012.

CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F.; CARDOSO, R. B. **Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da Meloidoginose em cana-de-açúcar**. 2009. 32 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista, São Paulo, 2009.

CARVALHO, A. L. U.; OLIVEIRA, F. H. P. C.; MARIANO, R. L. R; GOUVEIA, E. R.; SUETO-MAIOR, M. A.; Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology Biological and Applied Sciences**, v. 53, n. 3, maio./jun. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000300020>.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Determinação de pH em águas: método eletrométrico**. Norma Técnica L5.145. São Paulo, 1978.

CHEMICAL Book, 2019.

CHEN, P.; YAN, L.; WU, Z.; LI, S.; BAI, Z.; YAN, X.; WANG, N.; LIANG, N.; LI, H. A microbial transformation using *Bacillus subtilis* B7-S to produce natural vanillin from ferulic acid. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, fev. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20400>

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Início da colheita de milho confirma recorde de 250,5 milhões de toneladas na produção total de grãos.. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3446-inicio-da-colheita-de-milho-confirma-recorde-de-250-5-milhoes-de-t-na-producao-total-de-graos>>. Acessado em 24 de Agosto de 2021.

CONVERTI, A.; ALIKBARIAN, B.; DOMÍNGUEZ, JM.; BUSTOS, V.; VÁZQUEZ, G.; PEREGO, P. Microbial production of biovanillin. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, n. 3, p. 519-530, mar. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000300001>.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. ; PARISI, F. ; FERRAILOLO, G. Kinetic considerations about the study of alcoholic fermentations in starch hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 18, n. 5, p. 711-717, maio. 1986. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260280510>.

CORREIA, J. L. A. **Produção do bioaroma acetoina a partir de hidrolisado de melão por bactérias do gênero *Bacillus* isolados do sedimento de mangue**. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

DAMASIO, F.; PACHECO, S. M. V. Vanilina: Origem, propriedades e produção. **Química e Sociedade**. v. 32, n. 4, nov. 2010. Disponível em <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc32_4/02-QS3909.pdf>. Acessado em 15 de março de 2021.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642-645, mar. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S010040422005000400017>.

DHAMOLE, P. B.; DEMANNA, D; DESAI, S. A. Extraction of p-Coumaric Acid and Ferulic Acid Using Surfactant-Based Aqueous Two-Phase System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 2, p. 564–573, ago. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1107-8>.

DI GIOIA, D. *et al.* Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 4, p. 306-316, dez. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.014>.

FANI, M. Aromas e Biotecnologia. **Aditivo de Ingredientes**, p. 44-50, 2011.

FELIPE, L. **Isolamento e seleção de micro-organismo produtores de Bioaromas por Biotransformação de Terpenos**. 2015. 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia para o Desenvolvimento Sustentável) - Universidade Federal de São João Del-Rei.Campus Alto Paraopeba, Minas Gerais, 2015.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola - Química e Sociedade**, v. 3, n. 2, p. 120-130, maio. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>.

FLAVORNET. Disponível em <<http://www.flavornet.org/flavornet.html>>. Acessado em 10 de agosto de 2021.

FLEIGE, C.; HANSEN, G.; KROLL, J.; STEINBÜCHEL, A. Investigation of the *Amycolatopsis sp.* Strain ATCC 39116 Vanillin Dehydrogenase and Its Impact on the Biotechnical Production of Vanillin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 81-90, jan. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02358-12>

FOOD FLAVORS MARKET OVERVIEW. **Global Food Flavors Market**, 2018. Disponível em <<https://www.alliedmarketresearch.com/food-flavors-market>>. Acessado em 24 de agosto de 2021.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. Aroma. **Dossiê de aromas**, 2015.

GALAGE, N. J.; MOLLER B. L. Vanillin bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid.

Molecular Plant, v. 8, n. 1, p.40–57, dez. 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>.

GURUJEYALAKSHMI, G.; MAHADEVAN, A. Dissimilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*. **Current Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 69-73, mar. 1987.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01588174>.

JUN, N. *et al.* Mimicking a natural pathway for de novo biosynthesis: natural vanillin production from accessible carbon sources. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, mar. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep13670>.

KARMAKAR, B. *et al.* Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *bacillus coagulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 195-202, mar. 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00248-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00248-0).

KASANA, R.C.; SHARMA, U.K.; SHARMA, N.; SINHA A.K. Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin. **Current Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 457–461, maio. 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-006-0627-z>.

LABORCLIN. **MUELLER HINTON CALDO**. Disponível em <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Mueller_Hinton_Caldo_510061.pdf>. Acessado em 24 de julho de 2021

LABUDA, IVICA. **Handbook of Vanilla Science and Technology**. Biotechnology of Vanillin: Vanillin from Microbial Sources. 2. ed. v. 4, p. 460-488, 2018.

LAWTHER, J. M.; SUN, R.; BANKS, W. B. Fractional characterization of alkali-labile lignin and alkali-insoluble lignin from wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 5, p. 291–300, 1996. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0926-6690\(96\)00028-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0926-6690(96)00028-3).

LEFFINGWELL E ASSOCIATES. Vendas estimadas para 2013-2017 em milhões **Líderes da Indústria de Sabor e Fragrâncias**, 2018. Disponível em: <http://www.leffingwell.com/top_10.htm>. Acessado em 09 de outubro de 2019.

LESSAGE-MESSEN, L., *et al.* A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, p. 141-153, jun. 2002.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:141>.

LOPES, E. M. **Vanilla bahiana, fonte alternativa da Mata Atlântica para a produção de baunilha: uma abordagem proteômica através de nanoLC-MS de alta definição**. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Neotropical) –

Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

MELLO, R. A. 2011. 95 f. **Produção de bioaroma acetoína por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT 3800 através do processo fermentativo batelada alimentada**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3 p. 426-428, mar. 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MOLINA, G. E. A. Comparative study of the bioconversion process using R-(+) - and S-(-)- limonene as substrates for *fusarium oxysporum* 152b. **Food Chemistry**, v. 174, p. 606-13, maio. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.059>.

MORDOR INTELLIGENCE. Mercado brasileiro de sabores e melhoradores de alimentos - crescimento, tendências e previsão. **Food flavor and enhancer market industry**, 2018. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/brazil-food-flavor-and-enhancer-market-industry>>. Acessado em 09 de outubro de 2019.

MORDOR INTELLIGENCE. Mercado de sabores alimentares - crescimento, tendências e previsão (2019-2024), **Food flavor and enhancer market industry**, 2019. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/food-flavor-market>>. Acessado em 08 de outubro de 2019.

ODDOU, J. *et al.* Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 1-6, Jan. 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051605>.

OLIVEIRA, F. D. C. 2015. 199 f. **Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado**. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

OLIVEIRA, L. *et al.* Isolamento e seleção de microrganismo produtores de Bioaromas. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Fortaleza, Ceará, set. 2015.

OVERHAGE, J. *et al.* Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas sp.* strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (vdh) gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6 p. 820-828, nov. 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051598>.

PACHECO, S. M. V.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, propriedades e produção. **Química Nova na Escola - Química e Sociedade**, v. 32, n. 4, p. 215-219, nov. 2010.

PALMQVIST, E. A.; GUNNARSSON, N. Influence of pH and carbon source on the production of vanillin from ferulic acid by *Streptomyces setonii* ATCC 39116.

Developments in Food Science, v. 43, p. 73-78, 2006. DOI:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80018-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80018-X).

PAROUL N. **Síntese química de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Faculdade de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. 1 ed. São Paulo, McGraw-Hill, 1981.

PELCZAR, Jr, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; **Microbiology: Concepts and Applications** Mc Graw Hill, New York, 1993. 897 p.

PEREIRA, R. E. P.; PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 16, p. 1-12, jan. 2011. Disponível em:

<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/u94lwYWgePGj05L_20_13-6-26-11-11-29.pdf>. Acessado em 28 de junho de 2021.

PESSÔA, M. G. 2017. 159 f. **Prospecção de Biocatalisadores endofíticos para produção de Bioaromas**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2017.

POTUMARTHI, R., Ch. S.; JETTY, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 185–192, maio. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2006.12.003>.

RABENHORST, J.; STEINBUCHER, A.; PRIEFERT, H.; ACHTERHOLT, S. Enzyme and genes used for producing vanillin. **United States Patent Application Publication**. Pub. n° US 2003/00921143 A1, maio. 2003.

RAO, R. S.; RAVISHANKAR, G. A. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 3, p. 289–304, jul. 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0010\(200002\)80:3%3C289::AID-JSFA543%3E3.0.CO;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3%3C289::AID-JSFA543%3E3.0.CO;2-2).

RODRIGUEZ-VAZQUEZ, D.; DÍAZ-CERVANTES, D. Effect of chemical solutions sprayed on sugarcane bagasse pith to produce single cell protein: physical and chemical analyses of pith, **Bioresource Technology**, v. 47, n. 2, p. 159–164, mar. 1997. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90115-5](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(94)90115-5).

ROMÃO, D. R. 2015. 46 f. **Potencial de fibras de resíduo agrícola: palha de milho (*Zea mays L.*) para produção de celulose**. Monografia (Especialização em Engenheiro Florestal) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

RUAN, R.; LI, Y.; CHEN, P, L.; LIU, Z.; PAN, X.; LIN, X.; LIU, C, K.; MOK, T. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. **Transactions of the ASAE**, v. 47, n. 3, p. 821–25, maio. 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.13031/2013.16078>.

RUBERT, J.; ONDREJ, L.; ZACHARIASOVA, M; HAJLSLOVA, J. Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v. 204, p. 201–209, ago. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.003>.

SCHREIER, P. Aspects of biotechnological production of food flavors. **Food Reviews International**, v. 5, n. 3, p. 289–315, jan. 1989. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/87559128909540856>.

SHIMONI, E.; RAVID, U.; SHOHAM, Y. Isolation of a *Bacillus sp.* capable of transforming isoeugenol to vanillin. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 1, p. 1–9, fev. 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00199-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00199-6).

SUTHERLAND, J.B; CRAWFORD, D.L; POMETTO, A.L. Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*. **Can. J. Microbiol.** 29:1253–1257. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 1253–57, out. 1983. DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/m83-195>.

TORRE, P.; ALIAKBARIAN, B.; RIVAS, B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 500-509, jun. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.005>.

TORRE, P.; FAVERI, D.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; BARGHINI, P.; RUZZI, M.; FARIA, F. Selection of co-substrate and aeration conditions for vanillin production by *Escherichia coli* jm109/pbb1. **Food Technology. Biotechnology**. v. 42 p. 193-196, jul. 2004. Disponível em < https://www.researchgate.net/publication/228513560_Selection_of_Co-Substrate_and_Aeration_Conditions_for_Vanillin_Production_by_Escherichia_coli_JM109pBB1>. Acessado em 25 de julho de 2021.

TORRES, B. R. *et al.* Vanillin bioproduction from alkaline hydrolyzate of corn cob by *Escherichia coli* JM109/pBB1. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 44, n. 3, p. 154-158, mar. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.10.003>.

VASCONCELOS, M. D. S. **Obtenção de vanilina por via microbiana**. 2014. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

XU, F.; SUN R.; SUN, J.; LIU, C.; HE, B.; FAN J. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 207–17, nov. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.037>.

YAMADA, M.; OKADA, Y.; NAGASAWA, T. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 73, n. 5, p. 1025–30, jan. 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0569-1>.

YOON, S. H.; LI, C. ; KIN, J. E.; LEE, S. H.; YOON, J. Y.; CHOI, M. S.; SEO, W. T.; YANG, J. -K.; KIN, J. -Y.; KIN, S. -W. Production of vanillin by metabolical engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**. v. 27, p. 1829-1832, nov. 2005.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-005-3561-4>.

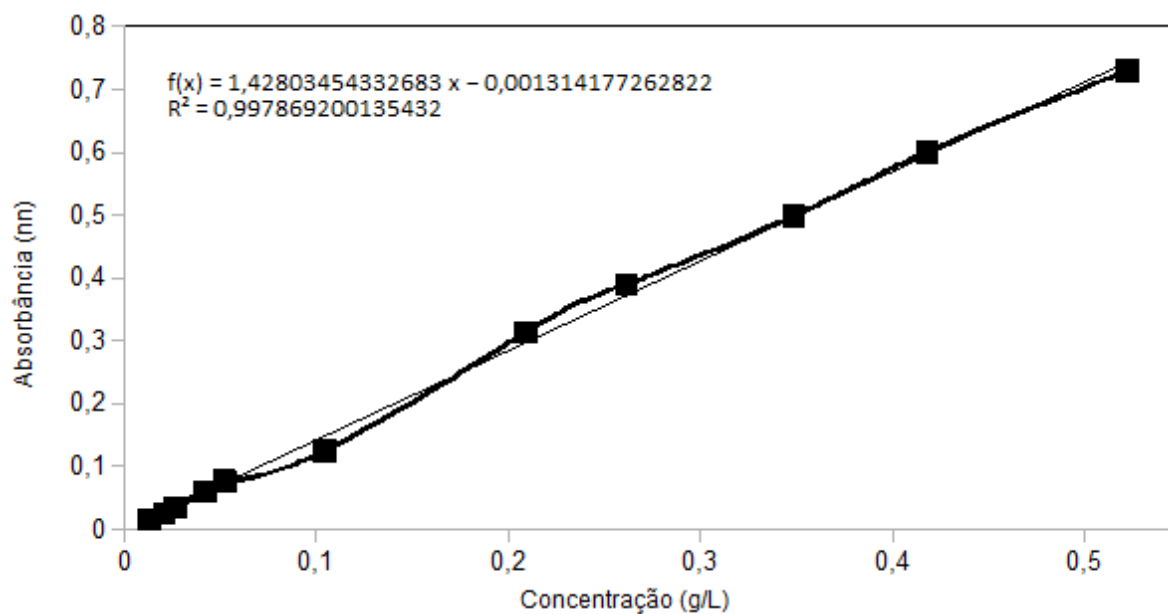
ZHANG, Y.; XU, P.; HAN, S.; YAN, H.; MA, C. Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p.771–779, dez. 2006.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0544-x>.

ZHAO, L. Q.; SUN, Z. H.; ZHENG, P.; HE, J, Y. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Bacillus fusiformis* CGMCC1347 with the addition of resin HD-8. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1673– 1676, jul. 2006.

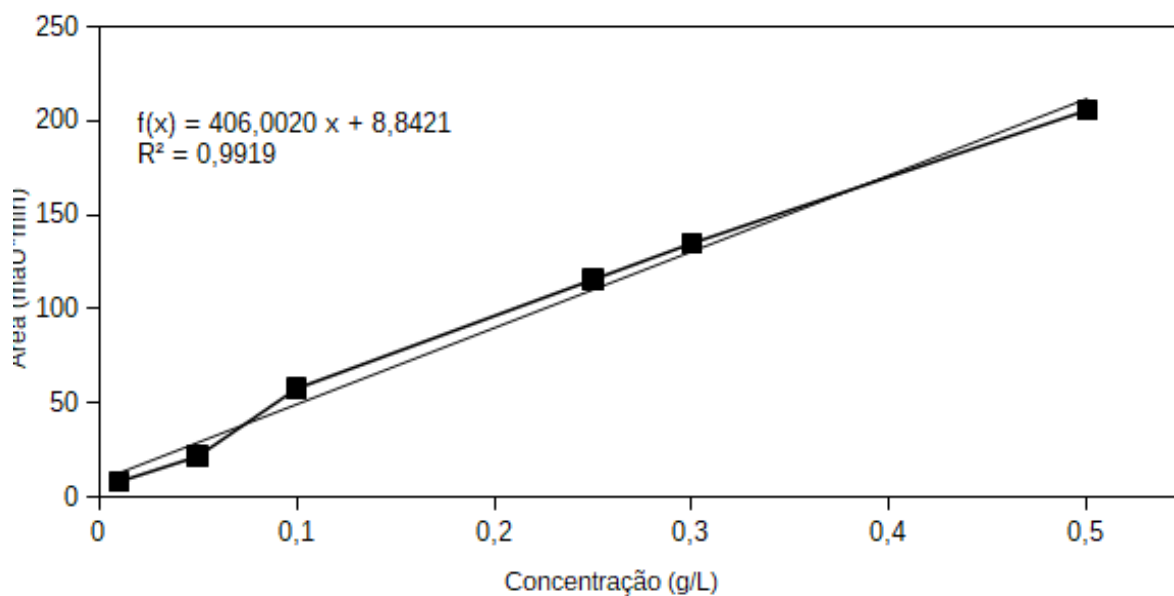
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.007>

**APÊNDICE A - Curva de crescimento do microrganismo *Bacillus subtilis*
ATCC6633**



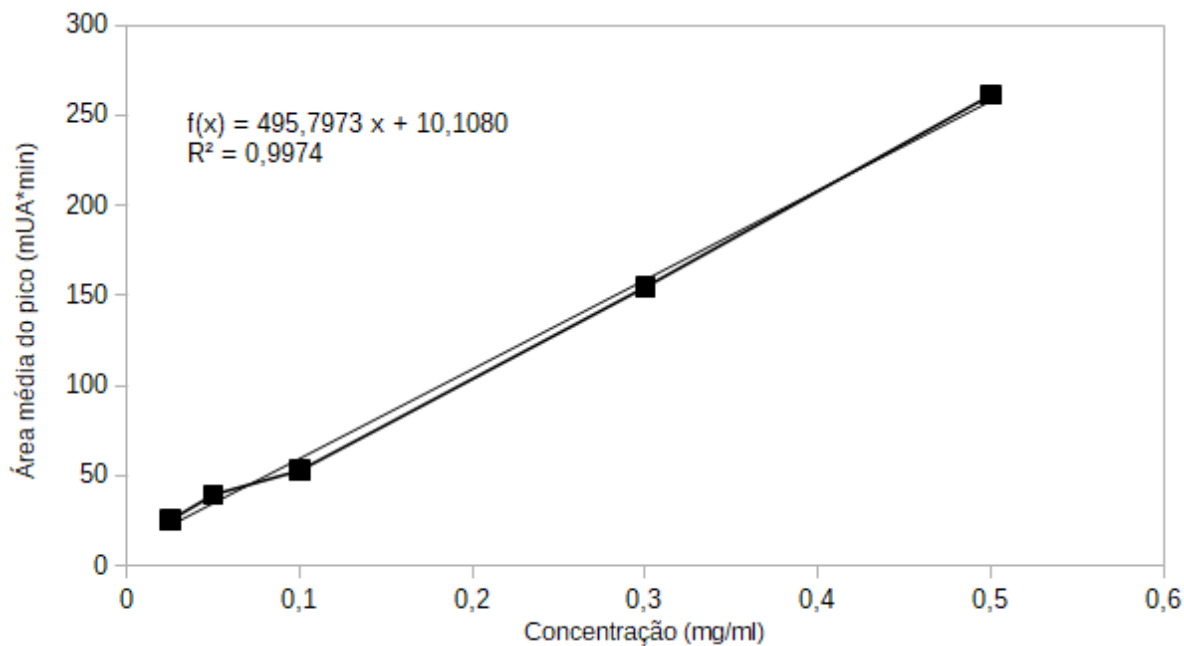
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE B - Relação entre concentração de Isoeugenol e área de detecção



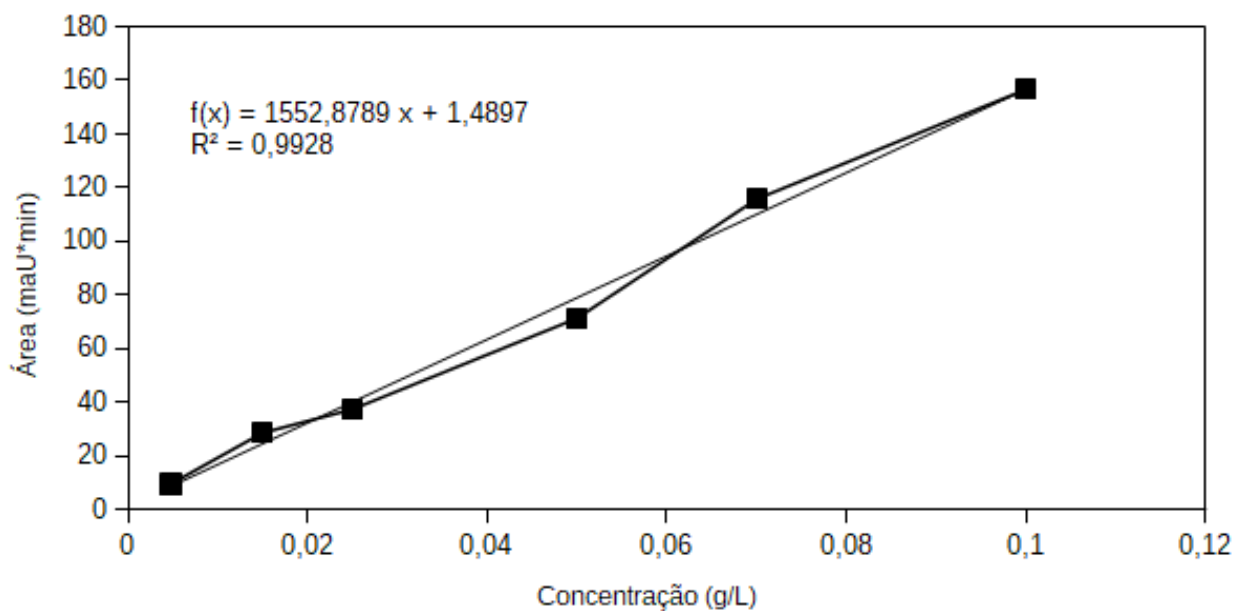
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE C - Curva de correlação entre a concentração de ácido ferúlico e área de detecção



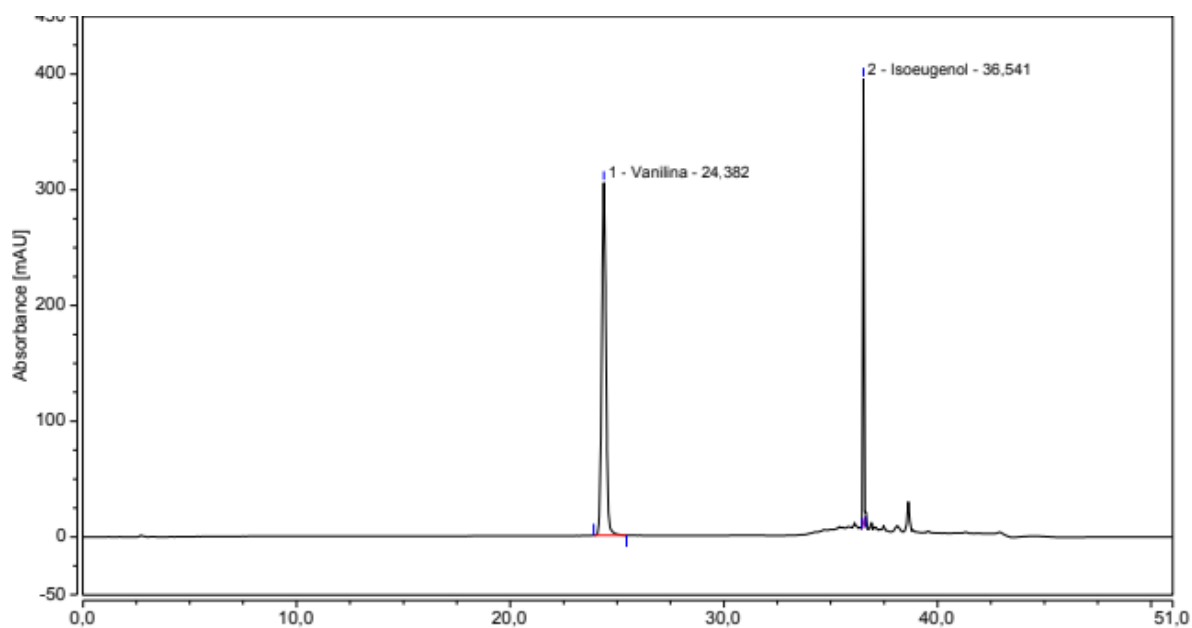
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE D - Relação entre concentração de vanilina e área de detecção



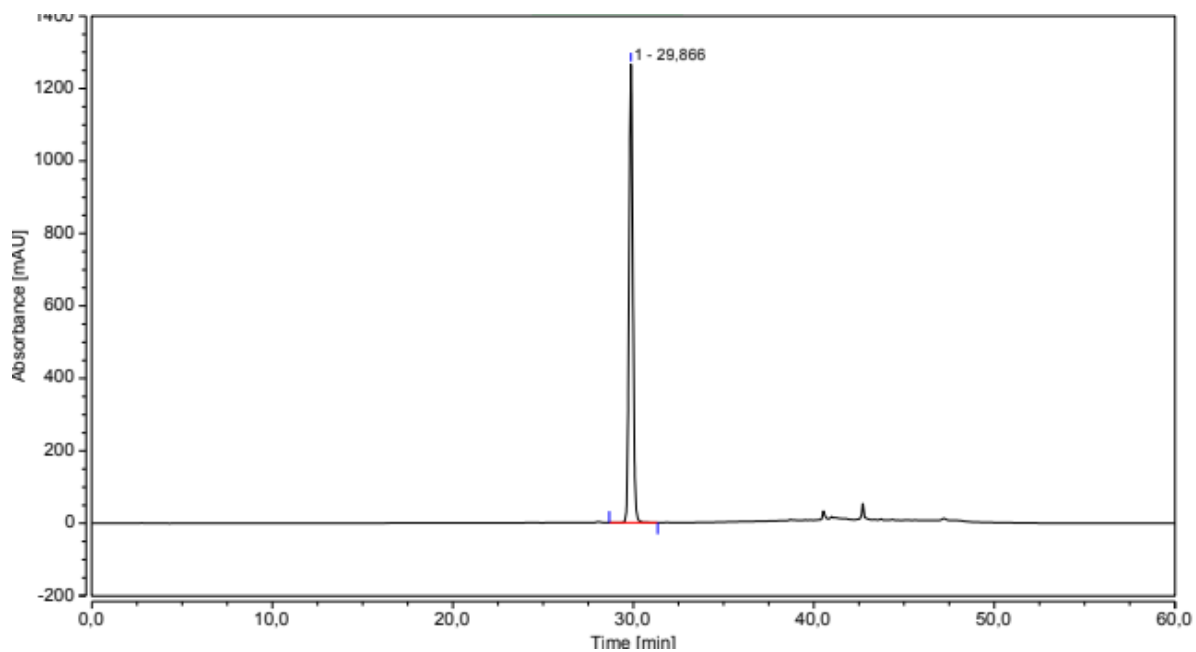
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE E - Cromatograma obtido por CLAE dos padrões de vanilina e Isoeugenol



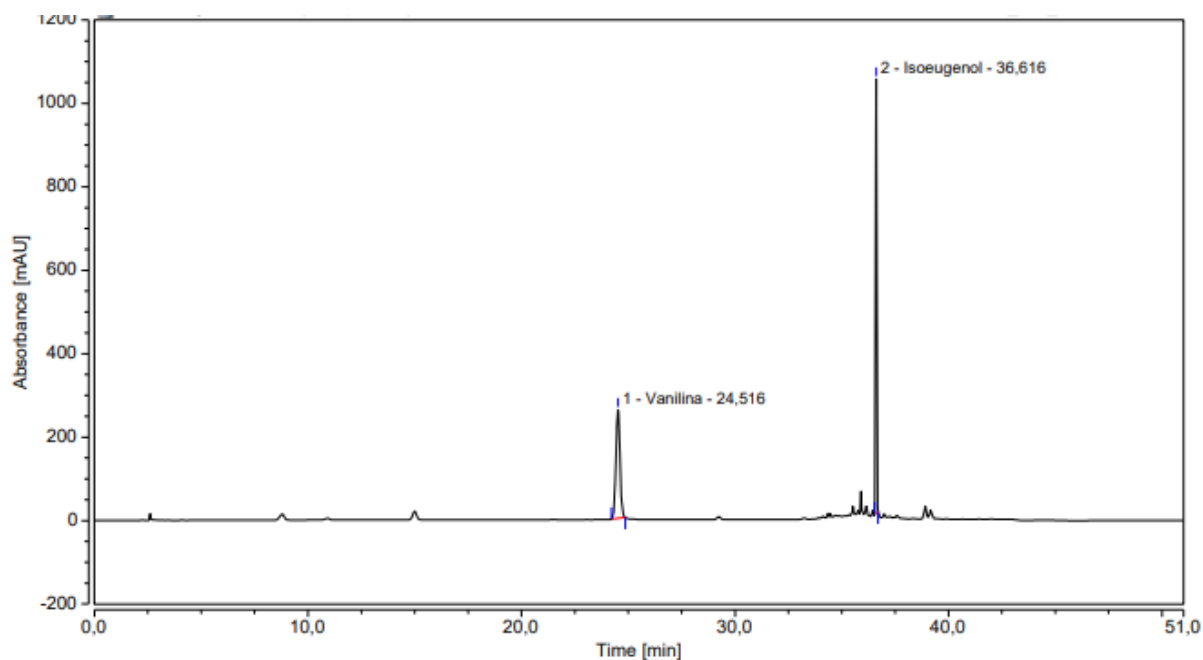
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE F - Cromatograma obtido por CLAE do padrão de ácido ferúlico



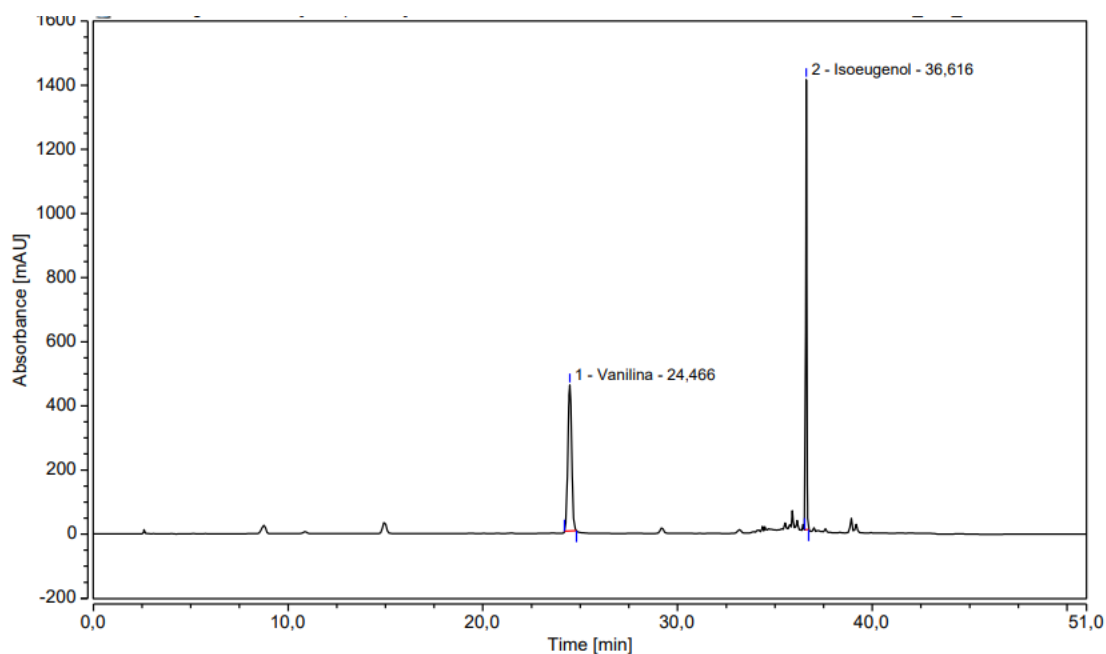
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE G - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com adição de 5 g/L de isoeugenol em 196 horas



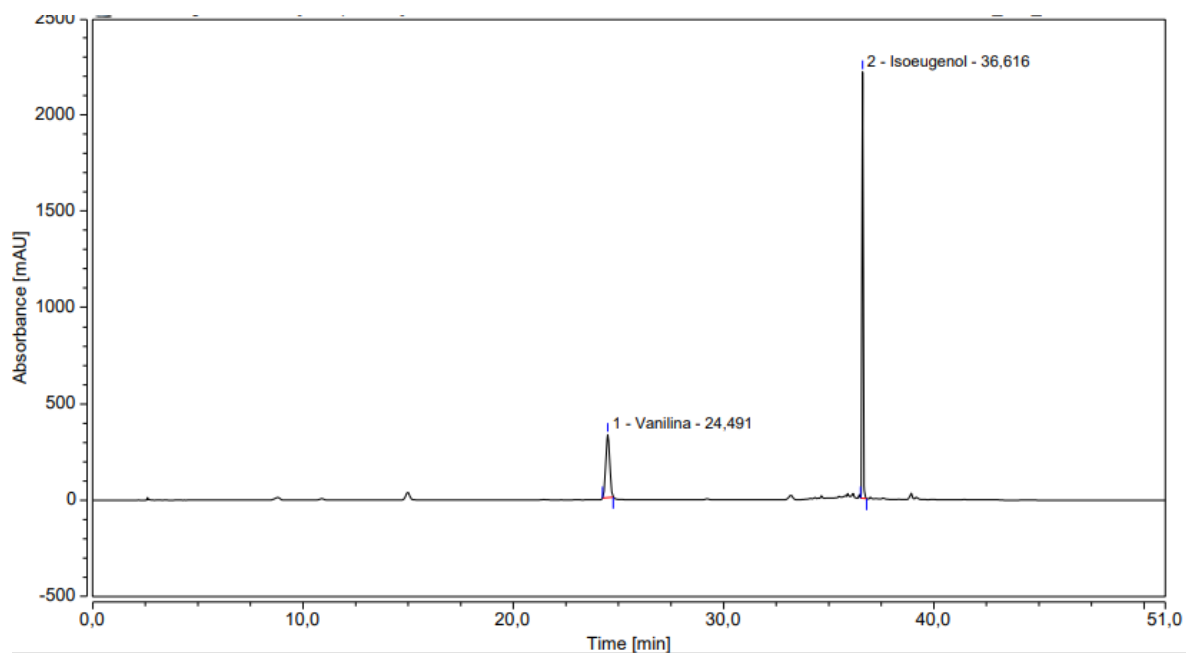
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE H - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com adição de 10 g/L de isoeugenol em 196 horas



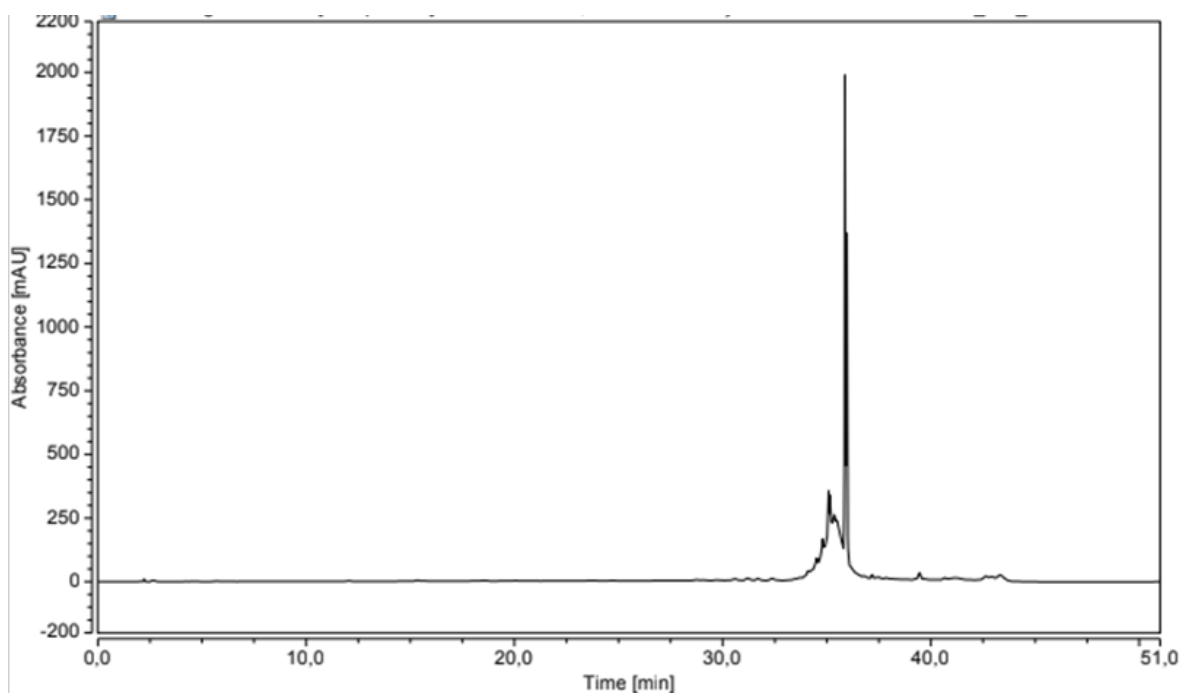
Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE I - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com adição de 15 g/L de isoeugenol em 196 horas



Fonte: Autoria própria, (2021).

APÊNDICE J - Cromatograma obtido por CLAE do processo fermentativo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com adição de 3,4 g/L de ácido ferúlico em 196 horas



Fonte: Autoria própria, (2021).