



UMA REVISÃO SOBRE ROTAS SINTÉTICAS E BIOTECNOLÓGICAS PARA PRODUÇÃO DE VANILINA

PACHECO, Sabrina Moro Villela; JUNIOR, Agenor Furigo; MORGADO, Ayres Ferreira;

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química, Campus Universitário, Trindade, cep 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil

* e-mail: sabrinavillela@gmail.com

Received 30 April 2007; received in revised form 20 July 2007; accepted 24 July 2007.

RESUMO

A vanilina (aroma de baunilha) é um dos compostos aromáticos mais utilizados nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. A vanilina natural pode ser obtida de uma orquídea, a *Vanilla planifolia*. No entanto, o processo de extração é lento e de custo elevado. Dessa forma, rotas para a obtenção de vanilina sintética passaram a ser adotadas, utilizando-se substratos como o eugenol e o licor negro (rejeito produzido pelas indústrias de papel e celulose). No entanto, devido ao grande volume de rejeitos produzidos através das rotas citadas, a partir da década de 70, passou-se a produzir vanilina utilizando-se o catecol e o guaiacol, oriundos da indústria petroquímica. O uso de substratos originários de fontes não renováveis e o aumento do consumo de produtos naturais impulsionaram nos últimos anos o estudo de novas rotas para a produção de vanilina através de processos biotecnológicos. Quando a vanilina é produzida através desses processos, é considerada como um produto natural, sendo esse fator importante, pois, eleva seu custo e sua procura no mercado. Considerando isso, o objetivo desta revisão foi abordar as diversas rotas sintéticas e, principalmente as biotecnológicas, que vêm sendo intensamente investigadas, e que utilizam microrganismos e enzimas.

Palavras-chave: *Vanilina, biotecnologia, rotas de produção.*

ABSTRACT

The vanillin (vanilla aroma) it is one of the aromatic compositions more used in the pharmaceutical industries and of foods. The natural vanillin can be gotten of a orchid, the *Vanilla planifolia*. However, the extraction process is slow and of high cost. Of this form, routes for the attainment of synthetic vanillin had passed to be adopted, using substrata as eugenol and the black liquor (I reject produced by the industries of paper and cellulose). However, had to the great volume of rejects produced through the cited routes, from the decade of 70, was transferred to produce it vanillin using itself catechol and guaiacol, deriving of the petrochemical industry. The originary substratum use of sources you did not renew and the increase of the consumption of natural products had in recent years stimulated the study of new routes for the production of vanillin through biotechnological processes. When the vanillin is produced through these processes, is considered as a natural product being this important factor, therefore, raises its cost and its search in the market. Considering this, the objective of this revision it was to approach the diverse synthetic routes and biotechnological routes, that come being intensely investigated, and that they use microorganisms and deriving enzymes of the same ones.

Keywords: *Vanillin, biotechnology, black liquor, review.*

Introdução

A vanilina ou 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído (Figura 1) é um composto aromático obtido tradicionalmente da vagem de uma orquídea tropical, a *Vanilla planifolia* (Figura 2), fazendo dela a única orquídea de interesse comercial fora do contexto ornamental. A publicação deste gênero de orquídea foi feita pela primeira vez, seguindo o sistema de Linneus, por Miller, em seu "Gardener's Dictionary", datado de 1754, com o nome latinizado de *Vanilla* (<http://www.1911encyclopedia.org/Vanilla>).

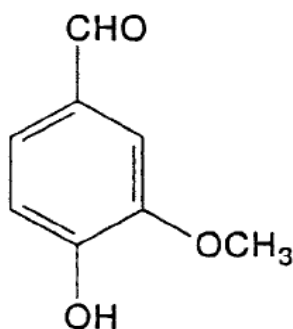


Figura 1 – Estrutura química da vanilina.



Figura 2 – Foto da orquídea *Vanilla planifolia* (<http://www.belizebotanic.org/orchid.jsp?name=Vanilla%20planifolia>).

Os astecas foram os primeiros povos a cultivar e extrair a vanilina desta orquídea, na qual foi levada para Europa pelos espanhóis após 1520, onde sua introdução foi praticamente instantânea. Atualmente, a *Vanilla planifolia* é cultivada em um grande número de países

tropicais sendo os maiores produtores o México, Madagascar, Tahiti e Indonésia (BYTHROW, 2005). A vanilina ocorre em pequena quantidade, da ordem de traços, em outras plantas como o tabaco. No entanto, as vagens desta orquídea ainda continuam sendo a principal fonte natural de vanilina. Embora mais de 12.000 toneladas de vanilina sejam produzidas por ano, menos de 1% é extraída da planta, o restante é sintetizada. O valor da vanilina natural oscila entre US\$ 1.200,00 e US\$ 4.000,00 por kg, em contraste com o preço da vanilina sintética, cujo kg custa menos de US\$ 15,00 (LOMASCOLO et al., 1999).

Produção natural de vanilina

A produção natural de vanilina resume-se basicamente na colheita das vagens da orquídea e no processo de maturação, das mesmas. A vanilina encontra-se nas vagens, sob a forma de gluco-vanilina, sendo que nestas condições não possui o aroma característico de baunilha. No entanto, após o processo de maturação que envolve a secagem e umificação das vagens e que pode durar até seis meses para ocorrer, a gluco-vanilina é hidrolizada enzimaticamente à glucose e vanilina (Figura 3) (HOCKING, 1997). O conteúdo de vanilina extraído por esse processo é de aproximadamente 2,5% (LAMPMAN et al., 1977).

A vanilina natural também pode ser obtida das vagens através de um processo de extração com etanol (60% v/v) em temperaturas brandas ou através da extração com fluidos quentes, onde as vagens são adicionadas sobre grades situadas em tanques de aço, onde o solvente é recirculado por um período de aproximadamente duas semanas (http://www.greener-industry.org/pages/vanillin/4Vanillin_PMS.htm#). A extração com etanol das vagens ainda é o processo mais vantajoso para a obtenção da vanilina (HOCKING, 1997).

Rotas para a produção de vanilina sintética

Os elevados custos, somados aos pequenos rendimentos da produção de vanilina natural e ao aumento do consumo da mesma, estimularam a pesquisa por rotas de produção de vanilina sintética. Dessa forma, em 1874-1875, menos de vinte anos após seu isolamento e caracterização, a molécula de vanilina foi sintetizada a partir do

eugenol tornando-se disponível comercialmente na França e Estados Unidos por US\$ 176,00/ kg (HOCKING, 1997). O eugenol (encontrado no óleo de cravo) continuou a ser utilizado como material de partida para a síntese de vanilina até 1920 (BLUN, 2006). Embora, a produção de vanilina por esta rota sintética possuir alto rendimento, a mesma consumia grandes quantidades de reagentes, o que desmotivou a produção da molécula por esse método. Mais tarde, a vanilina passou a ser sintetizada a partir da lignina contida no licor negro - um rejeito da indústria de papel e celulose (KORTEKAAS et al., 1998).

O licor negro é produzido no processo da lavagem da pasta obtida do cozimento Kraft da madeira. O processo Kraft tem como principal objetivo remover a lignina e outros extratos da madeira e produzir uma pasta com alto teor de celulose. O licor negro é constituído principalmente por lignosulfonatos e por compostos inorgânicos do licor de cozimento. O processo Kraft, consiste no cozimento da madeira a 160-180° C com uma solução de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio. Após a lavagem da pasta, tem-se como produto a pasta lavada, na qual ainda contém adsorvido à manta celulósica, compostos lignosulfonatos e íons metálicos, principalmente o sódio (OVERHAGE et al., 2006; RABENHORST, 1996; PRIEFERT et al., 1998). O efluente líquido resultante da lavagem da pasta é o licor negro e se caracteriza por possuir uma elevada alcalinidade, alto conteúdo de sólidos dissolvidos e uma grande diversidade de substâncias químicas oriundas da degradação de lignina (fenóis de baixa e alta massa molar de toxicidade reconhecida) e polissacarídeos (BONNIN et al., 2001).

A hipótese de que a vanilina poderia ser sintetizada a partir de substratos constituídos de lignina foi realizada através de uma publicação anônima em 1875 (HOCKING, 1997).

Mais tarde, esta possibilidade foi mais bem esclarecida pelo estudo de Tomlinson e Hibbert (1936), onde foi verificado que o rendimento de vanilina sintetizada variava de acordo com as características do licor negro e com o grau de sulfonação da lignina presente no mesmo. Esses autores verificaram que aproximadamente 5,9% de vanilina poderia ser obtida do licor negro utilizando a seqüência de reações ilustradas na Figura 4 (HOCKING, 1997).

A produção industrial de vanilina a partir da lignina contida no licor negro começou nos Estados Unidos em 1936 com a Salvo Chemical Corp. e a Marathon Paper Mills Co. de Wisconsin

utilizando a tecnologia desenvolvida por Tomlinson e Hibbert (1936) (KORTEKAAS, et al., 1998). Um ano depois a Howard Smith Paper Mills Ltd. desenvolveu a primeira planta de produção de vanilina em grande escala no Canadá. Estudos realizados pela Ontario Pulp and Paper em 1940, levaram a construção da segunda planta de produção de vanilina, chegando a uma produção de 227.000 Kg por ano em 1945 (HOCKING, 1997). Esta planta operava de forma integrada onde a primeira etapa do processo envolvia a fermentação dos açúcares contidos no licor negro com o objetivo de se produzir etanol. Na seqüência, o resíduo passava por uma etapa de oxidação com ar atmosférico a 160-170°C e 10-12 atm de pressão. Os produtos resultantes eram submetidos a duas etapas de extração – a primeira com tolueno e a segunda com solução aquosa de hidróxido de sódio. A solução aquosa resultante era constituída basicamente por vanilato de sódio que por sua vez, era purificado através da adição de ácido sulfuroso para a formação de um composto com o grupo sulfito e solúvel em meio aquoso (HOCKING, 1997). A produção de vanilina pela Ontario Pulp and Paper continuou expandindo até 3,4 milhões de Kg por ano em 1981, o que representava 60% do mercado mundial (HOCKING, 1997). Vale a pena ressaltar que, o licor negro utilizado para a produção da vanilina era obtido das unidades guaiacil. Dessa forma, a lignina era proveniente predominantemente de coníferas. Quando o processo de oxidação era realizado com lignina proveniente de folhosas o rendimento de vanilina era menor devido à baixa quantidade de unidades guaiacil. Embora a produção de álcool e vanilina a partir licor negro ter sido parcialmente motivada pelo interesse em reduzir o conteúdo de ligninas, açúcares e consequentemente a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) desse rejeito, o processo possuía muitos inconvenientes, como o fato de gerar um grande volume de resíduos tóxicos. Para ilustrar esta afirmação, é possível citar que para a produção de 1 kg de vanilina, eram utilizados 160kg de líquidos cáusticos e gerados 150kg de outras substâncias sem importância comercial e de reconhecido caráter tóxico (HOCKING, 1997; FURUKAWA et al., 1998). Eram usados 160 kg de líquidos cáusticos e foi o principal fator que levou ao fechamento das plantas no Canadá e EUA no fim da década de 80 e início de 90 (<http://www.-greener-industry.org/pages/vanillin/>).

Atualmente, ainda existem poucas fábricas que produzem vanilina a partir do licor negro como a Borregaard Industries de Sarpsborg –

Noruega.

As desvantagens apresentadas da síntese de vanilina a partir do licor motivaram a busca por novas rotas sintéticas, onde a mais utilizada atualmente é a que utiliza precursores oriundos da indústria petroquímica.

Existem várias rotas sintéticas e precursores da indústria petroquímica que podem ser utilizados para a síntese da vanilina (Figura 5). No entanto, os precursores mais utilizados são o catecol e o guaiacol. Embora, não sejam rotas que utilizem matérias-primas renováveis, possuem uma série de vantagens em relação à rota da lignina, como o fato de serem mais eficientes energeticamente e conseqüentemente mais econômicas. Além disso, produzem uma quantidade significativamente menor de rejeitos, por acarretarem maior rendimento de produto de interesse gerado e menor quantidade de subprodutos. A rota sintética de vanilina, dessa natureza e mais significativa, foi desenvolvida pela Rhodia desde 1970, no qual o guaiacol reage com ácido glicóxico por substituição aromática eletrofílica. O produto gerado é o ácido vanilmandélico, que posteriormente, é convertido à vanilina por descarboxilação oxidativa (HOCKING, 1997).

Apesar de a vanilina ser produzida de forma mais eficiente e menos poluente a partir de substâncias derivadas do petróleo, ainda existe o inconveniente da produção da mesma depender de uma matéria-prima não renovável. Esse fato se confronta com o empenho global de gerar energia e utilizar matérias-primas a partir de recursos renováveis - questão fundamental para o desenvolvimento sustentável.

Além disso, o incentivo ao aumento do consumo de produtos naturais motivou o desenvolvimento de muitas pesquisas para se produzir vanilina a partir de recursos renováveis e através de métodos biotecnológicos. Para as indústrias, tem-se tornado cada vez mais importante o uso de compostos que possam ser denominados "naturais", a fim de obter maior aceitação do consumidor (FURUKAWA et al., 1998). A vanilina produzida biotecnologicamente é considerada um produto natural e pode ser produzida com baixo custo, a partir do uso de substratos oriundos de fontes renováveis. Ela pode ser produzida biotecnologicamente através de uma série de substâncias de partida ou precursores gerados através do uso de extratos enzimáticos ou enzimas purificadas, microrganismos ou cultura de células de planta.

Produção biotecnológica de vanilina realizada por microrganismos

A produção de compostos aromáticos por fermentação microbiológica tem muitas vantagens se comparada à síntese química e enzimática. Em relação à síntese química as vantagens são: acesso à atividade e especificidade enzimáticas, condições brandas de reação, o que torna possível reduzir custos. Em relação à síntese enzimática, as vantagens de se usar microrganismos são: a reciclagem de cofatores necessários do próprio sistema biológico do microrganismo e uma atividade enzimática estável (FURUKAWA et al., 2003). As limitações da síntese biotecnológica utilizando-se microrganismos são: o baixo rendimento de produto, pois o mesmo não é acumulado, a toxicidade do substrato e do produto aos microrganismos e tempos longos de fermentação. Algumas fermentações são difíceis de proceder devido à morfologia do microrganismo (dificuldades de aeração, alta viscosidade, etc.) (KIRK e FARRELL, 1987; KRISNANGKURA e GOLD, 1979). Os subprodutos apresentam 'off flavours', (substâncias de odor e sabor desagradáveis), os quais devem ser removidos completamente, caso o produto seja utilizado em indústria de flavorizantes (FURUKAWA et al., 2003). Vários são os substratos utilizados como a produção biotecnológica de vanilina, dentre eles é possível destacar a vanilil-amina, eugenol, isoeugenol, ácido ferúlico e o ácido vanílico.

A vanilil-amina é um precursor encontrado em poucas quantidades na natureza. No entanto, pode ser obtido em quantidades significativas na capsaicina, o componente que confere o sabor picante da pimenta. Dentro deste contexto, alguns estudos demonstram a possibilidade de obtenção de vanilina através do uso da álcool vanilil oxidase em um meio contendo a vanilil-amina. A álcool vanilil oxidase (VAO; EC 1.1.3.38) (Figura 6) é uma enzima que contém em sua estrutura um grupo prostético 8α -(N3-histidil)-FAD covalentemente ligado. Sua função biológica ainda não é totalmente conhecida, embora alguns experimentos tenham revelado que a VAO está relacionada a biodegradação de 4-(metóximetil)fenol. A VAO possui a capacidade de converter uma grande diversidade de substratos de 4-hidróxibenzil alcoóis e 4-hidróxibenzilaminas em seus aldeídos correspondentes. O grupo alil de 4-alilfenóis é

também convertido em grupos $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (Figura 7) (LESAGE-MEESSEN et al., 1996).

A VAO é uma enzima relativamente “nova”, pois sua purificação e caracterização só ocorreu em 1992 a partir do *Penicillium simplicissimum* CBS 170.90 (Daugusch e Pastore, 2005). Os poucos trabalhos existentes relacionados à aplicação da VAO para a produção de vanilina, ilustram o seu significativo potencial de aplicação para esse fim (LESAGE-MEESSEN et al., 1996; WALTON et al., 2003; TOMLINSON e HIBBERT, 1936).

Outras enzimas envolvidas na produção de vanilina foram estudadas por YOSHIDA e colaboradores (1997). Esses autores investigaram a produção de vanilina de vanilil-amina através da (AO) amina oxidase de *Aspergillus niger* e (MAO) monoamina oxidase de *Escherichia coli*, que por sua vez, foi previamente isolada, caracterizada e clonada em laboratório. A oxidação da vanilil-amina foi realizada com as enzimas citadas. Análises cinéticas das reações enzimáticas revelaram que a AO foi mais eficiente para produzir vanilina que a MAO, onde a AO oxidou completamente a vanilil-amina à vanilina em 30 minutos. Outro substrato de partida muito utilizado é o eugenol. O eugenol é o principal componente do óleo de cravo, sendo muito utilizado em perfumes, flavorizantes, óleos essenciais e na medicina como anestésico local (SOARES e DURÁN, 1998).



Figura 6 – Representação da estrutura tridimensional da VAO de *Penicillium simplicissimum*. A disposição das oito cadeias polipeptídicas da VAO encontram-se ilustradas em cores diferentes.

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/3/38.html>).

A VAO também vem sendo utilizada para converter o eugenol a álcool coniferil, sendo que este pode ser convertido à vanilina através de vários microrganismos (LESAGE-MEESSEN et al., 1996). Algumas espécies de bactérias como a *Pseudomonas*, também vem se mostrando eficientes na biotransformação de eugenol à vanilina (STENTELAIRE et al., 2001. ZHENG et al., 2007).

O isoeugenol, um derivado do eugenol, também se mostrou como um interessante precursor para a síntese de vanilina. Para ilustrar essa afirmação, tem-se o trabalho de Shimoni, Ravid e Shomam (2000). Esses autores isolaram um microrganismo capaz de produzir vanilina a partir do isoeugenol. As bactérias foram isoladas do solo por sua capacidade de produção de vanilina. Uma das cepas, a B2 foi isolada por produzir grandes quantias de vanilina quando crescia em presença de isoeugenol como fonte de carbono. Baseando-se no perfil de ácidos graxos, a cepa B2 foi identificada como um *Bacillus subtilis* sp. A capacidade de bioconversão foi testada em diferentes meios de cultura. Na presença de isoeugenol, as culturas cresceram produzindo $0,64 \text{ g L}^{-1}$ vanilina. Rabenhorst e Hopp (1991) patentearam uma rota para produção vanilina através de isoeugenol com a bactéria *Serratia marcescens*, que por sua vez, foi capaz de promover a oxidação do isoeugenol em vanilina em concentrações de até $3,8 \text{ g L}^{-1}$.

O ácido ferúlico é outro substrato interessante para a produção da vanilina. Existem vários trabalhos publicados, exibindo diferentes rotas biotecnológicas de produção de vanilina através desse precursor, que pode ser encontrado em um vasto número de espécies de plantas, sendo o constituinte majoritário da lignina. O ácido ferúlico é abundante em muitos cereais como o farelo de trigo com $4-7 \text{ g kg}^{-1}$ de peso seco correspondente a materiais da parede celular e farelo de milho com aproximadamente 30 g kg^{-1} . O ácido ferúlico nesses materiais está presente na forma esterificada com carboidratos e pode ser liberado por tratamento com solução fortemente alcalina ou através de clivagem enzimática com cinamol esterase de *Aspergillus niger* (LAMPMAN et al., 1977).

O grupo de Lesage-Meessen da Unité de Biotechnologie des Champignons Filamenteux de Marseille – França possui vários estudos publicados sobre a produção de vanilina através de uma dupla fermentação, onde primeiramente o ácido ferúlico foi inoculado com *Aspergillus niger* para

gerar o ácido vanílico. Na sequência, o caldo resultante foi submetido a uma segunda fermentação com o *Pycnopus cinnabarinus*, para promover a redução do ácido vanílico à vanilina com bons rendimentos da mesma (VAN DEN HEUVEL et al., 2001a; VAN DEN HEUVEL et al., 2001b). Segundo este mesmo grupo de pesquisadores, existe uma grande variedade de enzimas envolvidas na biotransformação dos compostos pelos microrganismos mencionados, tais como as feruloil esterases que atuam na liberação do ácido ferúlico (VAN DEN HEUVEL, 2001c).

A possibilidade de se produzir biotecnologicamente este precursor também foi investigada. O trabalho de Rabenhorst (1996) ilustra um estudo mecanístico da produção de ácido ferúlico a partir do eugenol através de uma cepa de *Pseudomonas* (HR199). As reações são catalisadas sucessivamente pela eugenol hidroxilase, coniferil álcool dehidrogenase e coniferil aldeído dehidrogenase. A enzima correspondente, a eugenol dehidrogenase foi purificada e caracterizada de *Pseudomonas fluorescens* E118 (YOSHIDA et al., 1997) e atua sobre vários tipos de substratos como o álcool vanílico para formar vanilina. O ácido ferúlico também pode ser obtido através de extração solvente-solvente de resíduos agroindustriais (JONG et al., 1992).

O ácido vanílico, outro precursor que vem sendo muito estudado como intermediário para a síntese da vanilina, é uma substância conhecida por constituir um dos principais produtos de degradação da lignina e substâncias relacionadas através da ação de fungos da classe basidiomicetos e outros microrganismos (SHIMONI et al., 2000).

A possibilidade de biotransformação do ácido vanílico à vanilina também vêm sendo ilustrada pelo grupo de Lesage-Meessen, que realizou um estudo de produção de vanilina a partir do ácido vanílico em dois tipos de bioreatores (mecanicamente agitado e air-lift) com o *Pycnopus cinnabarinus*. O bioreator mecanicamente agitado produziu até 1260 mg L⁻¹ de vanilina. Foi possível verificar que a bioconversão do ácido vanílico, pelo fungo ocorre em baixas condições de oxigênio, baixa agitação e altas concentrações de carbono (KIRK e FARRELL, 1987). A rota para produção de vanilina através de ácido vanílico utilizando o *Pycnopus cinnabarinus* possui o inconveniente de formar um metabólito intermediário, a metóxihidroquinona. Estudos relacionados ao metabolismo do *Pycnopus cinnabarinus*

MUCL39532 e MUCL38467 demonstraram que o ácido vanílico sofre descarboxilação oxidativa para formar metóxihidroquinona ou é reduzido à vanilina e álcool vanílico. Para contornar esse problema Lesage-Meessen, Haon e Delattre (1997), realizaram um experimento adicionando celobiose durante o processo de fermentação, o que acarretou em um significativo aumento na produção de vanilina. Com base nesses resultados, é interessante citar que quando ocorre uma elevação na fonte de carbono do meio de cultivo, a produção de enzimas de stress nutricional (lacases e peroxidases) deixa de ocorrer. Segundo Krisnangkura e Gold (1979) essas enzimas são as principais responsáveis pela oxidação do ácido vanílico.

Considerações finais

A notória simpatia dos consumidores pelos ingredientes de origem natural tem impulsionado nos últimos anos um conjunto de indústrias e laboratórios a investir em pesquisa e desenvolvimento. Substantial progresso tem sido feito em relação à produção de sabores e aromas naturais usando “tecnologias limpas”. A preferência pelos produtos naturais deve-se a fatores como o apelo mercadológico e o fato de uma parcela significativa da população ser alérgica a uma série de produtos sintéticos.

Os produtos naturais, de modo geral, possuem maior custo, embora esse fato seja compensado pelos benefícios à saúde mencionados através de pesquisas e marketing. Os principais fatores que comandam os custos de produção são: energia, mão de obra e os materiais de partida. Os principais eventos que deverão influenciar no comportamento de consumo desses produtos não somente incluem aspectos tecnológicos, mas também desenvolvimentos em marketing, considerações regulatórias, econômicas e mais recentemente, no aumento da preocupação ambiental. Dessa forma, a área de biotransformação para a obtenção de vanilina, um dos aromas mais utilizados em uma série de áreas, possui um grande potencial e requer maiores pesquisas. Existem grandes possibilidades de se encontrar novos microrganismos que podem ser usados para aplicações práticas e mais viáveis para a indústria. Além disso, estudos para a bioprodução de vanilina têm levado a descoberta de várias enzimas interessantes e que geram novas oportunidades científicas.

Além da preocupação em se produzir vanilina natural através de processos biotecnológi-

cos, os substratos utilizados e a origem dos mesmos é outro ponto de interesse. Sabe-se, que uma grande parcela da vanilina utilizada atualmente, é produzida a partir de substratos oriundos da indústria petroquímica. Uma parcela menor advém do uso do licor negro, que, conforme já citado anteriormente, é um processo extremamente poluente por gerar um grande volume de efluentes tóxicos. Dessa forma, também existe a preocupação em se utilizar substratos oriundos de fontes renováveis e não poluentes.

A produção de vanilina apenas se tornará viável como um todo, ou seja, economicamente e de pouco ou nenhum efeito impactante ao meio ambiente, se puder ser utilizado um processo biotecnológico e sem o uso de qualquer substância química ou condições drásticas de reação com altas pressões e temperaturas.

Referências Bibliográficas

26. BKUN, L. Kraft Pulp Production. Environmental. Defence Fund, jan. 1996. Disponível em <<http://www.rfu.org/KraftPulp.htm>>. Acesso em: jan. 2006.
27. BONNIN, E. et al. *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin are also able to produce cell wall polysaccharide-degrading enzymes and feruloyl esterases. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 28, p.70-80, 2001.
28. BYTHROW, J. D. Historical perspective Vanilla as a medical plant. **Seminars in Integrative Medicine**, local, vol. 3, p. 129-131, 2005.
29. DAUGSCH, A., PASTORES, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, vol. 28, n.4, 642-645, 2005.
30. FURUKAWA et al. Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* I58 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. vol 96, n. 4, p. 401-403, 2003.
31. FURUKAWA et al. Purification and characterization of eugenol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* E118. **Archives Microbiology**, v.171, p.37-43, 1998.
32. HOCKING, M.B., Vanillin: syntetic flavoring from spent sulfite liquor. **Journal of Chemical Education**. vol. 74, p. 1055-1059, 1997.
33. JONG, E. et al. Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. A novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. **European Journal of Biochemistry**, v.208, p. 651-657, 1992.
34. KIRK, T.K., FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annals Reviews Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.
35. KORTEKAAS, S. et al. Anaerobic-aerobic treatment of toxic pulping black liquor with upfront effluent recirculation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. vol.86, p. 97-110, 1998.
36. KRISNANGKURA, K., GOLD, M.H. Peroxidase catalysed oxidative decarboxilation of vanillic acid to methoxy-p-hydroquinone. **Phytochemistry**, vol.18, p. 2019-2021, 1979.
37. LAMPMAN, G. M. et al., Preparation of vanillin from eugenol and sawdust. **Journal of Chemical Education**, vol. 54, p. 776-778. 1977.
38. LESAGE-MEESSEN, L. et al. An attempt to channel the transformation of vanillic acid into vanillin by controlling methoxyhydroquinone formation in *Pycnoporus cinnabarinus* with cellobiose. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 393-397, 1997.
39. LESAGE-MEESSEN, L. et al. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Journal of Biotechnology**, v.50, p. 107-113, 1996.
40. LOMASCOLO, A. et al. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. **Trends in Biotechnology**, vol. 17, p. 282-289, 1999.
41. OVERHAGE, J. et al. Harnessing eugenol as a substrate for production of aromatic compounds with recombinant strains of *Amycolatopsis* sp. HR167. **Journal of**

- Biotechnology**, vol. 125, n. 3, p. 369-376, 2006,
42. PERALTA-ZAMORA, P. et al. Evaluation of ZnO, TiO₂ and supported ZnO on the photoassisted remediation of black liquor, cellulose and textile mill effluents. **Chemosphere**, vol. 36, p. 2119-2133, 1998.
 43. PRIEFERT H. et al. Identification and molecular characterization of the eugenol hydroxylase genes (ehyA/ ehyB) of *Pseudomonas fluorescens* E118. **Archives Microbiology**, v. 171, p. 37-43, 1998.
 44. RABENHORST, J.; Hopper R.; DE **patente**. 19,532,317, 2000.
 45. RABENHORST, J. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemical by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. **Archives Microbiology**, v. 46, n. 46, p. 470-474, 1996.
 46. SHIMONI, E. et al. Isolation of a *Bacillus* sp. Capable of transforming isoeugenol to vanillin. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 1-9, 2000.
 47. SOARES, C.H.L., DURÁN, N. Degradation of low and high molecular mass fractions of Kraft E1 effluent by *Trametes villosa*. **Environmental Technology**, v.19, p. 883-891, 1998.
 48. SOARES, C. H.L., DURAN, N. Degradation of low and high molecular mass fractions of Kraft E1 effluent by *Trametes Villosa*, **Environmental Tecnology**, 19, 883-891, 1997.
 49. STENTELAIRE, C., et al. Design of a fungal bioprocess of vanillin production from vanillic acid at scalable level by *Pycnoporus cinnabarinus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol 89, n.3, p. 223-230, 2001.
 50. TOMLINSON, G., HIBBERT, H. Studies on lignin and related compounds. The formation of vanillin from waste sulfite liquor. **Journal American Chemical Society**, vol. 58, p.345-348, 1936.
 51. VAN DEN HEUVEL, R. H. H. et al. Enzymatic synthesis of vanillin. **Journal Agriculture Food Chemical**, v.49, p. 2954-2958, 2001(a).
 52. VAN DEN HEUVEL, R. H. H. et al. Tuning of the product spectrum of vanillyl-alcohol oxidase by medium engineering. **FEBS Letter**, v.503, p. 213-216, 2001(b).
 53. VAN DEN HEUVEL, R. H. H. Vanillyl-alcohol oxidase, a tasteful biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis Enzymatic: B**, v. 11, p. 185-188, 2001(c).
 54. YOSHIDA, A. et al. Vanillin formation by microbial amine oxidases from vanillylamine. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. vol 84, n.6, p.603-605, 1997.
 55. WALTON, N.J. et al. A. Molecules of interest: Vanillin. **Phytochemistry**, vol. 63, p. 505-515, 2003.
 56. ZHENG, L., ZHENG, P., SUN, Z., BAI, Y., WANG, J., GUO, X. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresource Technology**, vol 98, p.1115-1119, 2007.
 57. ŽNIDARŠIĆ, P., PAVKO, A. Morphology of Filamentous Fungi. **Food Technology Biotechnology**, v.39, p. 237-252, 2001.

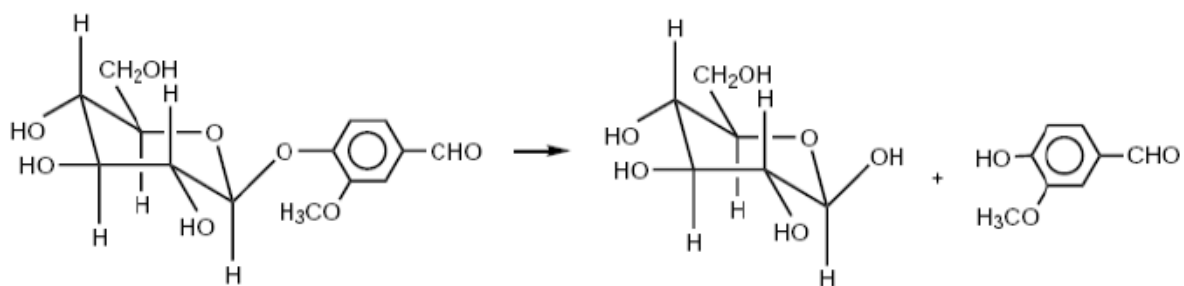


Figura 3 - Esquema ilustrativo da hidrólise enzimática de gluco-vanilina em glucose e vanilina (HOCKING, 1997).

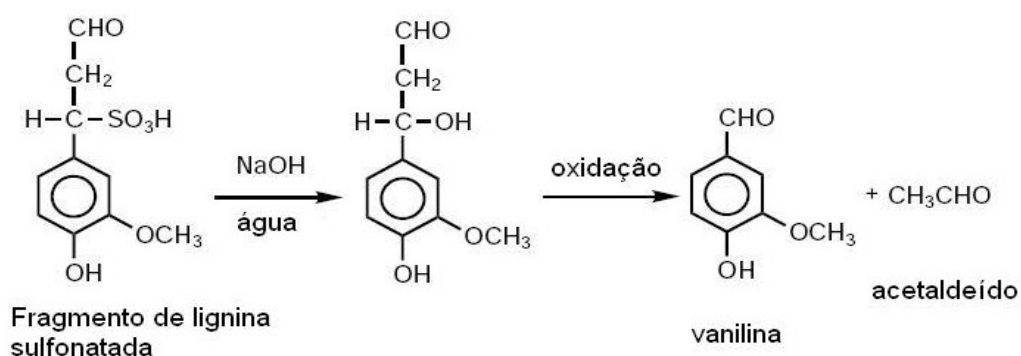


Figura 4 - Esquema ilustrativo da hidrólise enzimática de gluco-vanilina em glucose e vanilina (HOCKING, 1997).

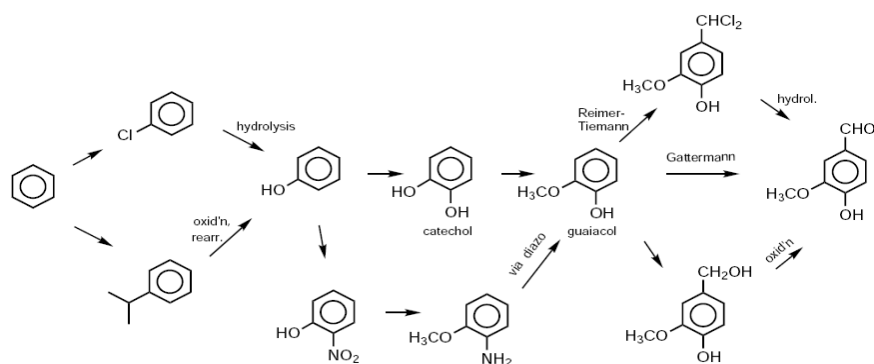


Figura 5 - Rotas para a síntese da vanilina através do uso de precursores oriundos da indústria petroquímica (HOCKING, 1997).

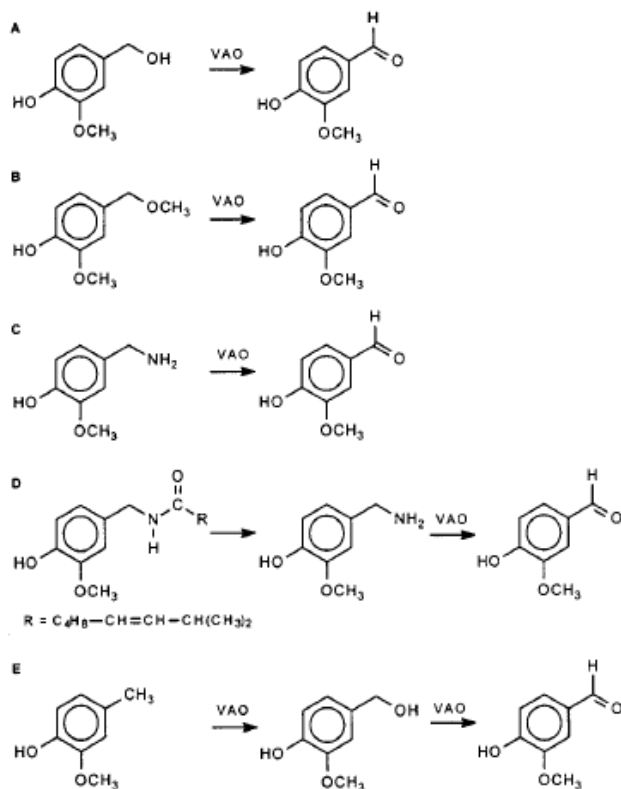


Figura 7 - A VAO catalisa a conversão de (A) álcool vanílico, (B) 2-metóxi-4-(metóximetil) fenol e (C) vanili-lamina para vanilina e em conversão de duas etapas a (D) capsaicina e (E) creosol para vanilina (LESAGE-MEESSEN et al., 1996).