



FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Carotenóides de bactérias halófilas: produção, caracterização e atividade antioxidante

Viviane Santos Miranda
Engenheira Agrônoma

Profa. Dra. **Adriana Zerlotti Mercadante**
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do
título de mestre em Ciências de Alimentos

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M672c Miranda, Viviane Santos
Carotenóides de bactérias halófilas: produção, caracterização e
atividade antioxidante / Viviane Santos Miranda. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2010.

Orientador: Adriane Zerlotti Mercadante
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Carotenóides. 2. Bactérias. 3. Atividade antioxidante. 4.
HPLC. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Carotenoids of halophily bactéria: production, characterization and antioxidant activity

Palavras-chave em inglês (Keywords): Carotenoids, Bacteria, Antioxidant activity, HPLC

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Adriane Zerlotti Mercadante

José Luiz Pereira

Fábio Marcio Squina

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(orientadora)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(membro)

Prof. Dr. Fábio Marcio Squina
(membro)

Prof. Dr. Fábio Yamashita
(membro)

Profa. Dra. Gabriela Macedo
(membro)

Dedico este trabalho

Ao meu noivo Rafael pelo amor, carinho, paciência, compreensão e incentivo em todos os momentos.

A minha mãe Jeni pelo amor, carinho, apoio e estímulo para conquistar mais essa vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente diariamente em minha vida me dando forças para realizar este trabalho.

A minha família em especial minha mãe Jeni pelo apoio e amor incondicional e ao meu irmão Wesley pelo carinho e incentivo.

Ao meu noivo Rafael, minha gratidão e admiração por todo seu amor companheirismo e compreensão até mesmo nos momentos de ausência.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante pela atenção, dedicação e pelas exigências na busca do conhecimento.

À banca examinadora, composta pelos professores José Luiz Pereira, Fábio Yamashita, Gabriela Macedo e Fábio Squina pela atenção e auxílio a mim e ao meu trabalho.

A todos do Laboratório de Toxinas Microbianas em especial ao Prof. José Luiz Pereira por todos os ensinamentos e atenção, a Norma pela amizade, atenção e apoio para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Fábio Yamashita pela atenção, paciência, ajuda e pelos conhecimentos transmitidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Química de Alimentos: Rosemar, Karla, Gislaine, Adélia, Poliana, Fernanda, Walquíria, Ana, Renan, Bruno, Renata, Fabíola, Mery, Elizeu, Naira, Aline e Milena pela amizade, ajuda em todos os momentos e pelo carinho.

A todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de fomento que tornou possível a realização deste trabalho.

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos, e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.”

Augusto Cury

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Estrutura química, propriedades e funções dos carotenóides	3
2.2 Antioxidantes.....	7
2.3 Microrganismos produtores de carotenóides	8
2.4 Microrganismos halófilos.....	11
2.5 Carotenóides de microrganismos halófilos	13
2.6 Fatores que exercem influência na produção biotecnológica de carotenóides.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material biológico	20
3.2 Meio de cultura e cultivo dos microrganismos	20
3.3 Determinação de biomassa seca	21
3.4 Determinação de carotenóides	21
3.4.1 Extração de carotenóides	21
3.4.2 Quantificação de carotenóides totais.....	22
3.4.3 Separação e identificação de carotenóides por HPLC-PDA-MS/MS	22
3.5 Determinação da atividade antioxidante	23
3.5.1 Atividade anti-radical livre	23
3.5.2 Atividade desativadora de $O_2(^1\Delta_g)$	24
3.6 Planejamento fatorial para cultivo da <i>Halococcus morrhuae</i>	24
3.6.1 Presença/ausência da luz no crescimento celular e na produção de carotenóides.....	25
3.6.2 Cinética de crescimento nas fases de pré-inóculo e inóculo	25
3.6.3 Variáveis do planejamento fatorial.....	26

3.7 Análise estatística dos dados.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Carotenóides produzidos pelas bactérias <i>Halococcus morrhuae</i> e <i>Halobacterium salinarium</i>	28
4.2 Biomassa, carotenóides totais e atividade antioxidante das bactérias <i>Halococcus morrhuae</i> e <i>Halobacterium salinarium</i>	42
4.3 Bioprodução de biomassa, carotenóides totais e atividade antioxidante por <i>Halococcus morrhuae</i>	46
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos carotenóides β -caroteno e licopeno.....	3
Figura 2. Estruturas de carotenóides com atividade pró-vitamina A.....	6
Figura 3. Estrutura química dos carotenóides detectados em <i>Halobacterium salinarium</i> e <i>Haloferax volcanii</i>	14
Figura 4. Estruturas dos isômeros geométricos cis da bacterioruberina	15
Figura 5. Biossíntese do carotenóide bacterioruberina e de seus derivados isolados de <i>Halobacterium salinarium</i>	16
Figura 6. Cromatograma, processado a 490 nm, obtido por HPLC-PDA-MS/MS, dos carotenóides de <i>Halococcus morrhuae</i> As condições cromatográficas estão descritas no item 3.4.3. A identificação e a caracterização dos picos estão apresentadas na Tabela 6	29
Figura 7. Cromatograma, processado a 490 nm, obtido por HPLC-PDA-MS/MS, dos carotenóides de <i>Halobacterium salinarium</i> . As condições cromatográficas estão descritas no item 3.4.3. A identificação e a caracterização dos picos estão apresentadas na Tabela 6	30
Figura 8. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do carotenóide all- <i>trans</i> -bacterioruberina (pico 11). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil <i>tert</i> -butílico.....	31
Figura 9. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do isômero 13- <i>cis</i> -bacterioruberina (pico 6). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil <i>tert</i> -butílico	32
Figura 10 Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do isômero 5- <i>cis</i> ,9'- <i>cis</i> -bacterioruberina (pico 9). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil <i>tert</i> -butílico.....	33
Figura 11 Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do isômero 5- <i>cis</i> -bacterioruberina (pico 12a). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil <i>tert</i> -butílico.....	34

Figura 12 Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do carotenóide all- <i>trans</i> -bisanidrobacterioruberina (pico 13). Solvente: gradiente linear de metanol/éter metil <i>tert</i> -butílico	35
Figura 13 Espectros UV-visível e de massas dos isômeros cis da bisanidrobacterioruberina (picos 2 e 10). Solvente: gradiente linear de metanol/éter metil <i>tert</i> -butílico	36
Figura 14 Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do carotenóide all- <i>trans</i> -trisanidrobacterioruberina (pico 14). Solvente: gradiente linear de metanol/éter metil <i>tert</i> -butílico	37
Figura 15 Espectros UV-visível e de massas do isômero cis da trisanidrobacterioruberina (pico 5). Solvente: gradiente linear de metanol/éter metil <i>tert</i> -butílico.....	38
Figura 16 Superfícies de resposta e curvas de contorno para biomassa (g/L) em função da concentração de NaCl (g/L) e pH (a), concentração de NaCl (g/L) e temperatura (°C) (b) e temperatura (°C) e pH (c)	50
Figura 17 Superfícies de resposta e curvas de contorno para carotenóides totais (µg/g) em função da concentração de NaCl (g/L) e pH (a), concentração de NaCl (g/L) e temperatura (°C) (b) e temperatura (°C) e pH (c).....	54
Figura 18 Superfícies de resposta e curvas de contorno para porcentagem de proteção (%) proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$ em função da concentração de NaCl (g/L) e pH (a), concentração de NaCl (g/L) e temperatura (°C) (b), e temperatura (°C) e pH (c)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais carotenóides utilizados como corante	5
Tabela 2 Microrganismos com potencial para produção biotecnológica de carotenóides.....	10
Tabela 3 Composição do meio <i>Halobacterium</i>	20
Tabela 4 Variáveis e valores utilizados nos níveis do delineamento composto central rotacional para cultivo da bactéria halófila.....	27
Tabela 5 Valores codificados da matriz do delineamento composto central rotacional 2 ³ com pontos axiais e 3 pontos centrais para cultivo da bactéria <i>Halococcus morrhuae</i>	27
Tabela 6 Características dos carotenóides, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS, produzidos por <i>Halococcus morrhuae</i> e <i>Halobacterium salinarium</i>	39 e 40
Tabela 7 Porcentagem relativa de área dos carotenóides de <i>Hcc. morrhuae</i> e <i>Hbt salinarium</i> separados por HPLC-PDA-MS/MS	43
Tabela 8 Biomassa, carotenóides totais, atividade desativadora do radical ABTS ^{•+} (valor de TEAC) e de O ₂ (¹ Δ _g) (% proteção).....	44
Tabela 9 Valores reais e codificados da matriz do delineamento composto central rotacional 2 ³ e respostas obtidas para <i>Halococcus morrhuae</i>	47
Tabela 10 Coeficientes de regressão e erro padrão do modelo para produção de biomassa.....	48
Tabela 11 Coeficientes de regressão e erro padrão do modelo para concentração de carotenóides totais	51
Tabela 12 Coeficientes de regressão e erro padrão do modelo para porcentagem de proteção	55

RESUMO

O interesse pelos carotenóides tem aumentado consideravelmente nos últimos anos pela evidência dos seus já conhecidos benefícios à saúde humana, devido às suas propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas e imunomodulatórias. As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química e a extração a partir de plantas e microalgas, porém são poucos os carotenóides cuja produção seja economicamente viável. Considerando que os microrganismos extremófilos são importantes fontes de compostos bioativos e que algumas bactérias extremófilas produzem carotenóides com características estruturais muito diferentes das encontradas nos alimentos, os objetivos deste trabalho foram: identificar os carotenóides produzidos pelas bactérias *Halococcus morrhuae* (ATCC 17082) e *Halobacterium salinarium* (ATCC 33171), através de cromatografia líquida de alta eficiência conectada aos detectores de arranjo de diodos e de massas (HPLC-DAD-MS/MS) e estudar, através de planejamento fatorial, o efeito de diferentes condições de cultivo no crescimento de biomassa celular, produção de carotenóides e proteção proporcionada pelos carotenóides contra o oxigênio singlete ($O_2(^1\Delta_g)$). Foram identificados 8 carotenóides nas linhagens de *Hcc. morrhuae* e *Hbt salinarium*. O carotenóide majoritário foi all-*trans*-bacterioruberina, seguido dos seus isômeros geométricos 13-*cis*-bacterioruberina, 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina, e 5-*cis*-bacterioruberina e de seus derivados all-*trans*-bisanidrobacterioruberina, *cis*-bisanidrobacterioruberina e *cis*-trisanidrobacterioruberina. O carotenóide all-*trans*-trisanidrobacterioruberina foi encontrado apenas em *Hcc. morrhuae*. A bactéria *Hcc. morrhuae* apresentou maior concentração de carotenóides totais, cerca de 87,9 µg/g de massa seca, do que a *Hbt. salinarium* (44,5 µg/g de massa seca). Ambas as bactérias apresentaram alta desativação do radical ABTS^{•+} e valores próximos da capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC). A bactéria *Hcc. morrhuae* apresentou melhor desativação do $O_2(^1\Delta_g)$, 27% de proteção e a *Hbt. salinarium*, cerca de 10% de proteção. Portanto a linhagem *Hcc. morrhuae* foi escolhida para para estudar a quantidade de biomassa, teores de carotenóides totais e atividade antioxidante, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³.

A variável temperatura foi a que mais influenciou a produção de biomassa, de carotenóides totais e a porcentagem de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. A máxima produção de biomassa foi observada com 279,76 g/L de NaCl, pH 6,4 e temperatura de 34 °C. A maior concentração de carotenóides totais e de porcentagem de proteção foi observada a 250 g/L de NaCl, pH 6,0 e 40 °C.

Palavras-chave: carotenóides, bactéria extremófila, atividade antioxidante, planejamento fatorial completo, HPLC-PDA-MS/MS.

ABSTRACT

The interest on carotenoids has considerably increased in the last years due to the known evidence of their benefits to the human health, related to their antioxidant, anticarcinogenic and immune modulation properties. The major industrial sources of carotenoids are chemical synthesis and extraction from plants and microalgae; however, there are few carotenoids whose production is economically feasible. Considering that extremophile microorganisms are important sources of bioactive compounds and that some extremophile bacteria produce carotenoids with different structural characteristics as compared with those found in foods, the aims of this work were: identify, through HPLC-DAD-MS/MS, the carotenoids produced by the bacteria *Halococcus morrhuae* (ATCC 17082) and *Halobacterium salinarium* (ATCC 33171), and to evaluate, applying factorial design, the effect of different growth conditions on the results of cell biomass, carotenoid production and protection against singlet oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$). Eight carotenoids from *Hcc. morrhuae* and *Hbt salinarium* strains were identified. The major carotenoid was all-*trans*-bacterioruberin, followed by its geometrical isomers 13-*cis*-bacterioruberin, 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberin and 5-*cis*-bacterioruberin and its derivatives all-*trans*-bis-anhydrobacterioruberin, *cis*-bis-anhydrobacterioruberin and *cis*-tris-anhydrobacterioruberin. The carotenoid all-*trans*-tris-anhydrobacterioruberin was only found in the *Hcc. morrhuae* strain. *Hcc. morrhuae* showed higher concentration of total carotenoids, about 87.9 $\mu\text{g/g}$ of dry mass, than *Hbt. salinarium* (44.5 $\mu\text{g/g}$ of dry mass). Both bacteria showed high scavenger activity of ABTS^{•+} and similar trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values. The bacterium *Hcc. morrhuae* showed 27% protection against $O_2(^1\Delta_g)$ and *Hbt. salinarium* about 10% protection, therefore *Hcc. morrhuae* strain was chosen to perform the complete factorial design. A response surface methodology (2^3) was applied to evaluate the production of biomass, content of total carotenoids and antioxidant activity. The variable temperature had more influence on biomass production, total carotenoids and percentage of protection provided by carotenoids against the $O_2(^1\Delta_g)$. The maximum production of biomass

was observed at 279.76 g/L of NaCl, pH 6.4 and 34 °C. The highest concentration of total carotenoids and percentage of protection was observed at 40 °C, 250 g/L of NaCl and pH 6.0.

Key-words: carotenoids, extremophile bacteria, antioxidant activity, complete factorial design, HPLC-PDA-MS/MS

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha, presentes em frutas, vegetais, pássaros, crustáceos e microrganismos. Além de seu uso como corantes nas indústrias de alimentos, de cosméticos, de rações, farmacêutica e têxtil, os carotenóides apresentam uma importante função nutricional na dieta de humanos como precursores de vitamina A. Além disso, o interesse por estes compostos naturais tem aumentado nos últimos anos devido a outras propriedades biológicas desejáveis, tais como imunomoduladoras, anticarcinogênicas e prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas (Krinsky, 1994). Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, mas de maneira geral, a redução do risco dessas doenças envolve a redução ou inibição de reações de oxidação, em outras palavras, a prevenção do estresse oxidativo resultante de um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade de defesa antioxidante das células. Os ROS envolvem tanto espécies radicalares, tais como ânion superóxido, radicais hidroxilas e peroxilas ($\text{ROO}^\bullet$), como não radicais (oxigênio singlete ($\text{O}_2(^1\Delta_g)$ e peróxido de hidrogênio), que podem causar danos ao DNA, proteínas e lipídios.

Os carotenóides agem como antioxidantes, através da desativação de radicais livres (Miller et al., 1993; Bohm et al., 2002), seqüestro de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Di Mascio et al., 1989; Montenegro et al., 2004) ou desativação do estado triplete de sensibilizadores (Montenegro et al., 2004; Rios et al., 2007). Quanto maior o número de ligações duplas conjugadas, maior a capacidade antioxidante do carotenóide, tanto no caso da inibição do radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) (Bohm et al., 2002) como na desativação de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Di Mascio et al., 1989).

As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química e a extração a partir de plantas e microalgas. Os processos de síntese química apresentam várias desvantagens como a necessidade de desenvolvimento de rotas de síntese específicas para cada novo carotenóide, a dificuldade na síntese de carotenóides mais complexos, a produção de misturas de esteroisômeros com

produção de alguns isômeros não presentes na natureza, além da questão da poluição ambiental causada pelos resíduos gerados nestes processos (Ausich, 1997). A demanda global para carotenóides tem crescido em torno de 2,3% ao ano e espera-se atingir US\$ 919 milhões em 2015; e atualmente a maioria dos carotenóides comercializados no mercado é derivada da síntese química (Gu et al., 2008),

A produção de carotenóides por processos biológicos apresenta várias razões que tornam este tipo de abordagem muito atrativa, destacando-se a grande diversidade biológica para produção destes pigmentos, sendo que o conhecimento do processo metabólico de um carotenóide pode ser aplicado a outros carotenóides. Além disso, há possibilidade de produção de compostos naturais estéreo-específicos e de estrutura complexa, produção de pigmentos a partir de substratos de baixo custo e, também, utilizar ferramentas de biologia molecular para desenvolvimento de novos sistemas biológicos mais eficientes para produção de carotenóides (Johnson & Schroeder, 1995; Ausich, 1997).

Durante os últimos anos, esforços têm sido direcionados no desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides, com destaque para a produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* (Feofilova, 1994; López-Nieto et al., 2004) e *Dunaliella* sp. (Borowitzka & Borowitzka, 1989; Ben-Amotz, 1999; Spolaore et al., 2006) e a produção de astaxantina por *Haematococcus* sp (Johnson & An, 1991) e *Phaffia rhodozyma* (Yamane et al., 1997; Parajó et al., 1998; Liu et al., 2006).

Muitos ambientes considerados extremos e hostis para a sobrevivência e crescimento de organismos vivos são colonizados por microrganismos, que estão especificamente adaptados a estes nichos ecológicos, e que podem ser considerados uma importante fonte de recursos, não somente para a exploração de novos produtos biotecnológicos, mas também como modelos para investigar como determinadas biomoléculas são estabilizadas quando submetidas a condições extremas (Rothschild & Mancinelli, 2001). Os ecossistemas extremos envolvem tanto os vulcões, gêiseres, profundidades marinhas, salinas, desertos,

neves eternas, altas altitudes, lagos alcalinos, entre outros. (Rothschild & Mancinelli, 2001).

A pesquisa no desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides é justificada pela crescente demanda por novas fontes destes pigmentos, que deve aumentar ainda mais com o conhecimento do grau de eficiência da ação antioxidante de carotenóides com estruturas diferentes das encontradas em alimentos.

2. SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura química, propriedades e funções dos carotenóides

Carotenóides possuem como estrutura básica um tetraterpeno de 40 átomos de carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e com simetria invertida no centro. Esse esqueleto básico pode ser modificado através de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, encurtamento ou extensão da cadeia, isomerização, introdução de substituintes ou combinações destes processos. Mais de 700 diferentes carotenóides isolados de fontes naturais já foram caracterizados (Britton et al., 2004). A **Figura 1** apresenta a estrutura química de carotenóides com 40 carbonos.

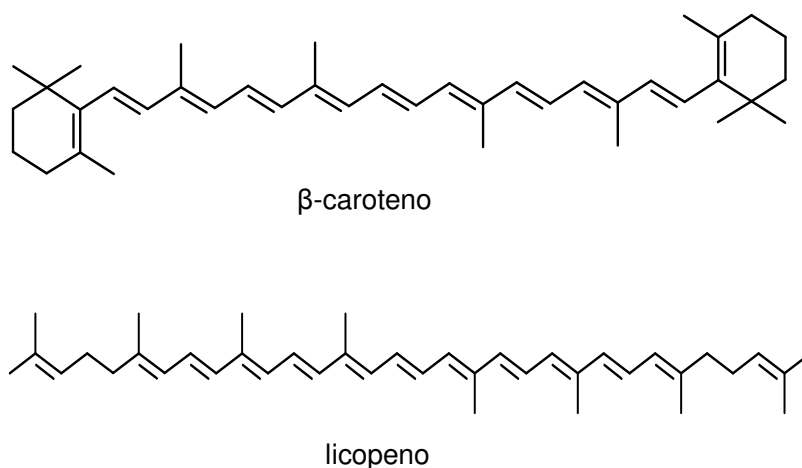


Figura 1. Estrutura química dos carotenóides β -caroteno e licopeno.

Os carotenóides apresentam na sua cadeia uma alternância de ligações duplas e simples que geram um sistema de elétrons π que se desloca sobre toda a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias alta reatividade química e absorção de luz na região do visível. Além disso, o número de ligações duplas conjugadas influencia na capacidade de absorver luz na região do visível, na cor, bem como nas propriedades funcionais (Britton, 1995).

Ao mesmo tempo em que o sistema de ligações duplas conjugadas confere cor aos carotenóides, este também os tornam susceptíveis à isomerização e oxidação. Fatores como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor e da atividade pró-vitamínica. Portanto, vários cuidados devem ser tomados durante a extração de carotenóides, tais como proteção contra a luz, análise em curto espaço de tempo, uso de atmosfera inerte, uso de baixa temperatura e adição de antioxidante.

Por outro lado, a cadeia poliênica dos carotenóides é responsável pela desativação de radicais livres e de oxigênio singlete, espécies altamente reativas responsáveis pela iniciação da oxidação nas células e que causam danos como destruição de DNA e peroxidação lipídica (Caris-Veyrat, 2007).

Os carotenóides estão presentes em tecidos fotossintéticos onde desempenham a função de proteger a clorofila e o aparelho fotossintético contra a fotodegradação. Além disso, os carotenóides absorvem luz nos comprimentos de onda que a clorofila não absorve, proporcionando uma absorção de luz em uma faixa maior de comprimento de onda. Os carotenóides também conferem proteção ao DNA de alguns microrganismos contra alta incidência de luz solar.

Nas indústrias de alimentos os carotenóides são usados como corantes para colorir os alimentos incolores, realçar e uniformizar a cor de alguns produtos alimentícios e repor a cor dos alimentos durante o processamento e armazenamento. Também são utilizados como aditivos em rações para aquicultura com o objetivo de promover a pigmentação adequada de alguns animais, como exemplo, o uso de astaxantina na ração de salmão e de camarão (Aksu & Eren, 2007) e, o uso de luteína e zeaxantina na pigmentação de gema de

ovos de galinha (Alcântara & Sanchez, 1999). Além disso, alguns carotenóides são adicionados aos alimentos com o propósito de fortificar os produtos alimentícios devido à atividade pró-vitâmica A de alguns carotenóides. Os principais carotenóides utilizados como corantes estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Principais carotenóides utilizados como corante.

Carotenóide	Fontes não microbianas	Fontes microbianas	Usos
β-caroteno	cenoura	<i>Dunaliella salina</i>	corante para alimentos
	síntese química	<i>Blakeslea trispora</i>	
	crustáceos	<i>Mycobacterium lacticola</i>	
astaxantina	penas de pássaros	<i>Phaffia rhodozyma</i>	ração para peixes
	síntese química	<i>Haematococcus pluvialis</i>	
	crustáceos		
cantaxantina	penas de pássaros	<i>Rhodococcus maris</i>	ração para aves e peixes
	síntese química	<i>Anabaena variabilis</i>	
licopeno	tomate	<i>Blakeslea trispora</i>	corante para alimentos
	síntese química		
luteína	alfafa, milho e flores	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	ração para aves e
			corante para alimentos
zeaxantina	alfafa, milho e flores	<i>Flavobacterium sp</i>	ração para aves
capsantina	páprica	não há	corante para alimentos
			ração para aves e alimentos
bixina	urucum	não há	corante para alimentos
crocetina	açafrão	não há	corante para alimentos
β-apo-8'-carotenal	síntese química	não há	ração para aves
etil β-apo-8'-carotenoato	síntese química	não há	ração para aves

Fonte: Adaptado de Squina (2001).

Alguns carotenóides apresentam função na dieta de humanos como precursores da vitamina A, sendo essenciais para a visão, diferenciação celular, desenvolvimento embriológico e outros processos fisiológicos. As pró-vitaminas A constituem a maior fonte de vitamina A da dieta. O β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina são exemplos de carotenóides que possuem atividade pró-vitamina A, (**Figura 2**). A exigência para um carotenóide possuir atividade pró-vitáminica A é ter um anel- β não substituído, com uma cadeia poliênica de no mínimo 11 carbonos. Assim, o β -caroteno é o carotenóide de maior potência vitamínica A e ao qual se atribui 100% de atividade.

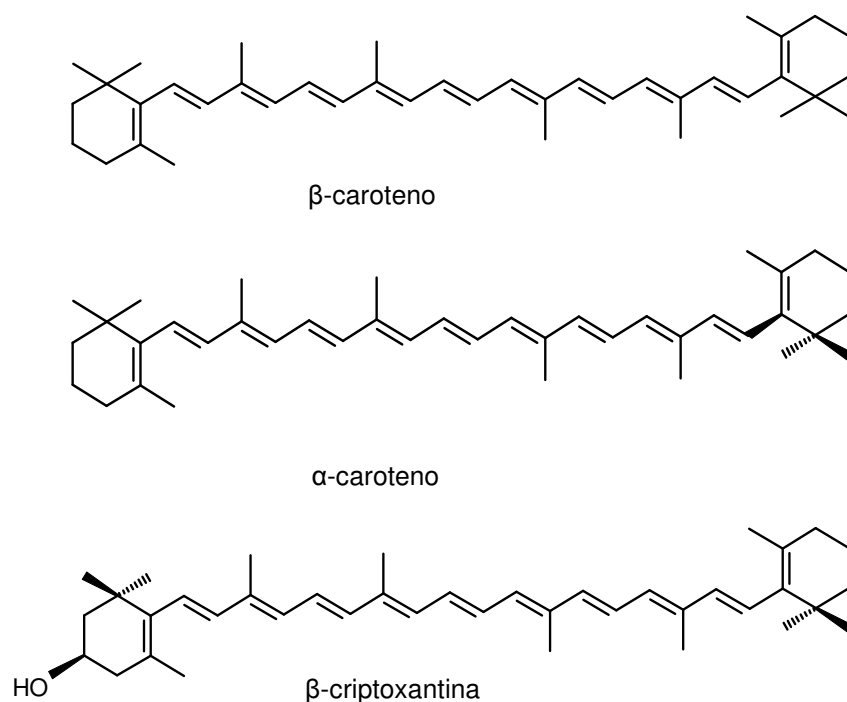


Figura 2. Estruturas de carotenóides com atividade pró-vitamina A.

Além da atividade pró-vitáminica A, outras funções biológicas têm sido atribuídas aos carotenóides, tais como: melhoria do sistema imunológico, prevenção de câncer e de doenças cardiovasculares e a redução dos riscos de catarata e degeneração macular (Krinsky, 1994; Gomes, 2007). Essas funções biológicas têm sido atribuídas às propriedades antioxidantes dos carotenóides,

incluindo a capacidade de seqüestrar o $O_2(^1\Delta_g)$ e desativar os radicais livres. Quanto maior o número de ligações duplas conjugadas, maior a capacidade antioxidante do carotenóide (Di Mascio et al., 1989; Bohm et al., 2002).

2.2 Antioxidantes

O termo antioxidante pode ser definido como uma substância sintética ou natural adicionada a produtos para prevenir ou retardar a deterioração pela ação do oxigênio do ar (Halliwell, 1995). Os antioxidantes têm grande importância para a indústria de alimentos devido à prevenção da oxidação em cadeia de lipídeos e proteínas.

A atividade antioxidante é determinada pelas suas características estruturais como a capacidade de agir como agente doador de hidrogênio ou de elétrons, reatividade com outros antioxidantes, potencial de quelar metais e estabilidade do radical do antioxidante formado (Rice-Evans et al., 1997).

O $O_2(^1\Delta_g)$ pode ser gerado de diversas formas, seja por processos físicos, químicos e fotoquímicos. Um destes processos, chamado de fotossensitização, pode ocorrer intracelularmente ou em uma solução através de um mecanismo de transferência de energia a partir do estado eletrônico triplete excitado de uma molécula orgânica ou inorgânica, conhecida como sensibilizador, para o oxigênio molecular no estado eletrônico fundamental triplete (3O_2). Este mecanismo é conhecido como oxidação tipo II. Outro mecanismo conhecido como tipo I consiste na formação de radicais livres, através da desativação do sensibilizador no estado triplete excitado pela associação direta com outra molécula. Em sistemas biológicos, moléculas como clorofilas, riboflavina, mioglobina, hemoglobina e porfirinas absorvem luz na região do visível e atuam como sensibilizadores para produção de $O_2(^1\Delta_g)$ e radicais livres. Alguns corantes artificiais como o azul de metileno e a rosa de bengala possuem a mesma capacidade de atuar como sensibilizadores.

Na presença de um antioxidante, o oxigênio singlete gerado pode ser desativado via processo químico, com formação de produtos de oxidação, ou mediante um processo físico de desativação com liberação de energia na forma

de calor. Os carotenóides são conhecidos como excelentes desativadores de $O_2(^1\Delta_g)$, pois o processo físico é predominante (Mascio et al., 1989).

Os carotenóides também atuam como potentes desativadores de radicais livres. Os testes para medir a atividade anti-radical livre podem ser divididos em dois grupos: métodos diretos que avaliam a peroxidação lipídica no qual se usa um substrato (lipídio, lipoproteína) e mede-se o grau de inibição da oxidação e, os métodos indiretos que medem a habilidade de aprisionar ou desativar radicais livres.

Os procedimentos indiretos empregados na avaliação da capacidade anti-radical livre de compostos puros e de extratos complexos estão baseados na medida do consumo de radicais livres estáveis quando é adicionado um agente antioxidante à solução. Assim, o decréscimo da concentração do radical livre está relacionado com a habilidade do composto adicionado de capturar radicais livres (Prior et al., 2005; Roginsky & Lissi, 2005).

O radical $ABTS^{\bullet+}$ vem sendo muito utilizado na análise indireta da atividade anti-radical livre por apresentar algumas vantagens como rapidez, estabilidade e facilidade de manuseio (Prior et al., 2005; Roginsky & Lissi, 2005). Por outro lado, os métodos indiretos apresentam desvantagens, pois o valor da capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) caracteriza apenas a capacidade da amostra avaliada em reagir com o radical $ABTS^{\bullet+}$ ao invés de inibir o processo oxidativo. Além disso, o radical $ABTS^{\bullet+}$ possui baixa seletividade na reação com doadores de átomos de hidrogênio (Roginsky & Lissi, 2005).

2.3 Microrganismos produtores de carotenóides

Os carotenóides podem ser produzidos por microrganismos fotossintetizantes, como microalgas azuis e verdes e por microrganismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras (Johnson & Schroeder, 1995).

Apesar da grande diversidade de organismos capazes de sintetizar carotenóides, poucos são utilizados no desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides, pois nem todos são

economicamente viáveis. Os carotenóides são sintetizados intracelularmente, sendo necessário o isolamento da biomassa celular para extração dos pigmentos por solventes orgânicos. A rigidez da parede celular de alguns microrganismos limita a extração dos carotenóides, portanto é necessário o uso de métodos abrasivos (Squina & Mercadante, 2003), químicos (Sedmak et al. 1990) ou enzimáticos (Johnson et al., 1978) para romper a parede celular e recuperar os pigmentos, entretanto esses métodos aumentam os custos de produção. Porém, o uso da biologia molecular está sendo bastante utilizado com o objetivo de obter microrganismos que produzam carotenóides extracelularmente.

Dentre os carotenóides sintetizados por microrganismos pode-se destacar a produção de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* (Feofilova, 1994) e pelas microalgas verdes dos gêneros *Dunaliella* (Borowitzka & Borowitzka, 1989); a produção de astaxantina pela microalga de água doce *Haematococcus* sp. (Johnson & An, 1991) e pela levedura *Phaffia rhodozyma* (Yamane et al., 1997; Parajó et al., 1998) (**Tabela 2**). Os carotenóides β -caroteno e astaxantina produzidos por *Dunaliella salina* e por *Haematococcus pluvialis*, respectivamente, estão sendo comercializados há alguns anos (García-González et al., 2005).

A espécie *Dunaliella salina* é uma importante fonte de β -caroteno. O cultivo comercial é realizado de maneira eficiente em tanques abertos, em regiões onde a elevada incidência luminosa e a alta salinidade geram um estresse nas células (desequilíbrio osmótico), as quais respondem com a síntese de β -caroteno e glicerol (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Os carotenóides produzidos por *Dunaliella salina* atuam como protetor solar para o DNA celular e para a clorofila. Provavelmente a alta produção de β -caroteno seja uma maneira de diminuir a alta quantidade de carbono assimilada durante a fotossíntese (Borowitzka & Borowitzka, 1989). A Índia possui a maior indústria produtora dessa microalga e o β -caroteno produzido é destinado ao uso farmacêutico. Outras grandes indústrias produtoras estão localizadas na Austrália, Estados Unidos, China, Mongólia e Japão; pequenas plantas também são encontradas no México, Chile, Cuba, Irã e Taiwan (Dufossé et al., 2005).

Tabela 2. Microrganismos com potencial para produção biotecnológica de carotenóides.

Microrganismos	Carotenóides	Referências
Bactérias		
<i>Halobacterium salinarium</i>		Kelly et al. (1970)
<i>Halococcus morrhuae</i>	bacterioruberina e derivados de	Kushwaha et al. (1974)
<i>Haloferax volcanii</i>	bacterioruberina	Ronnekleiv & Liaaen-Jensen (1995)
<i>Micrococcus roseus</i>		Chattopadhyay et al. (1997)
<i>Thermus thermophilus</i>	termozeaxantina, termocriptoxantina	Hara et al. (2008); Yokoyama et al. (1996)
<i>Rhodothermus marinus</i>	termozeaxantina	Lutnaes et al. (2004)
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	astaxantina	Yokoyama et al. (1994)
<i>Mycobacterium brevicale</i>	astaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
Fungos		
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	astaxantina	Hu et al. (2006)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	astaxantina e β -caroteno	Liu et al. (2006); Parajó et al. 1998)
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno	Feofilova (1994)
<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. rubra</i>	torularodina, tolureno, γ -caroteno, β -caroteno	Squina et al. (2002)
<i>Flavobacterium sp.</i>	zeaxantina	Dufossé (2006)
Algas		
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno	Dufossé et al. (2005)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	astaxantina	Orosa et al. (2005)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	luteína	Johnson & Schroeder (1995)
Cianobacterias		
<i>Anabaena variabilis</i>	cantaxantina	Johnson & Schroeder (1995)
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>		
<i>Nostoc commune</i>		

A espécie *Haematococcus pluvialis* é conhecida pela habilidade de acumular astaxantina, a qual é aplicada na indústria farmacêutica, nutracêutica e nutrição animal. Porém o maior mercado para a astaxantina tem sido a aquicultura, onde é adicionada na ração para peixes, moluscos e crustáceos (camarão) para conferir cor avermelhada (Lorenz & Cysewski, 2000). Os Estados

Unidos, Japão e Índia são os maiores produtores de astaxantina em escala comercial (Dufossé et al., 2005).

A produção industrial de astaxantina possui menos vantagens que o processo de produção biotecnológica de β -caroteno. A alga *Haematococcus pluvialis* habita lagos de água doce, sendo um fator que aumenta a possibilidade de contaminação por outras espécies de algas. Portanto, o cultivo desta alga deve ocorrer em ambientes fechados, possibilitando um maior controle das condições de cultivo e de contaminações.

A espécie de levedura *Blakeslea trispora* é uma fonte industrial de β -caroteno e mais recentemente de licopeno. A produção industrial em larga escala de licopeno está nos estágios iniciais (Mantzouridou & Tsimidou, 2008).

2.4 Microrganismos halófilos

Organismos que vivem em ambientes extremos são denominados extremófilos, tanto extremos físicos (temperatura, radiação ou pressão) como geoquímicos (dissecação, salinização, pH, potencial de redução ou oxidação) são incluídos em ambientes extremos. Além disso, os organismos que se desenvolvem em extremo nutricional e alta densidade populacional também são considerados extremófilos. Os microrganismos halófilos são extremófilos, pois necessitam de alta concentração de sais, adaptam-se a ambientes extremos e podem contribuir para a descoberta de novos produtos biotecnológicos (Rothschild & Mancinelli, 2001).

A adaptação dos microrganismos halófilos às condições ambientais extremas obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para a sua sobrevivência. Deste modo, todos os microrganismos halófilos possuem um potente mecanismo de transporte baseado na expulsão de íons sódio (Na^+) do interior da célula (Oren, 1999).

Diferentes estratégias são utilizadas por diferentes grupos de microrganismos halófilos para obter alta pressão osmótica no citoplasma e manter baixa a concentração de Na^+ . As bactérias halófilas pertencentes à família *HALOBACTERIACEAE* acumulam altas concentrações de KCl para balancear as

altas concentrações de Na^+ circundante no meio, já outros organismos halófilos acumulam solutos orgânicos, como por exemplo glicerol, que contribuem para a estabilização osmótica das células (Oren, 2002).

Alguns microrganismos halófilos produzem carotenóides, como metabólico secundário, com a função de proteger o DNA celular contra a alta incidência de luz. Além disso, a proteína bacteriorrodopsina, produzida por alguns organismos pertencentes à família *HALOBACTERIACEAE*, está localizada na membrana celular e ao ser estimulada pela luz funciona como uma bomba de prótons formando ATP, através da isomerização *cis-trans* do cromóforo retinol, convertendo energia luminosa em energia química, podendo apresentar, portanto, algumas aplicações biotecnológicas, como por exemplo, a construção de elementos bioeletrônicos para memória de computadores (El-Sayed et al., 2002; Oren, 2002).

As espécies *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarium* são bactérias halófilas extremas, pertencentes à família *HALOBACTERIACEAE* (Skerman et al., 1980; Grant & Larsen, 1989). O gênero *Halococcus* apresenta células em forma de cocos, Gram negativas, não esporuladas, aeróbias estritas e possuem parede celular com alta rigidez, conferindo proteção contra lise celular em soluções hipotônicas (Rodriguez-Valera et al., 1982; Larsen & Grant, 1989). O gênero *Halobacterium* possui espécies com células em forma de bastonete, Gram negativas, algumas se movem por flagelos e são aeróbias estritas, mas outras espécies podem ser anaeróbias facultativas ao crescer em meio contendo ou não nitrato. Neste gênero ocorre lise celular em soluções hipotônicas. As espécies *Hcc. morrhuae* e *Hbt. salinarium* possuem colônias vermelhas ou laranja-avermelhadas e são catalase e oxidase positivas (Bergey's et al., 1984; Larsen & Grant, 1989).

A espécie *Halobacterium salinarium* apresenta ótimo crescimento nas concentrações de 3,5-4,5 M NaCl e nenhum crescimento abaixo de 3 M NaCl. Além deste sal, esta bactéria necessita de 0,005-0,05 M de Mg^{2+} e apresenta crescimento na faixa de temperatura de 20-55 °C e entre valores de pH 5,5 e 8,5 (Larsen & Grant, 1989). A temperatura ótima de crescimento para a espécie

Halococcus morrhuae é de 30-37 °C e o pH ótimo é 7,2 (Larsen & Grant, 1989). Wang et al. (2007) utilizaram meio de cultura com 20% NaCl, pH 7,0 e temperatura de 37 °C para crescimento da espécie *Halococcus morrhuae*.

As espécies *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarium* habitam lagos salinos ou áreas com alta concentração de sal, são resistentes à desidratação, dessecação e suportam o estresse osmótico, pois acumulam íons e compostos orgânicos de baixo peso molecular no citoplasma, protegendo contra a desidratação e dessecação citoplasmática (Brown, 1976; Yancey et al., 1982).

2.5 Carotenóides de microrganismos halófilos

A bactéria *Halobacterium salinarium* produz carotenóides de cadeia longa com 50 carbonos, tais como, all-*trans*-bacterioruberina, monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina, trisanidrobacterioruberina e tetraanidrobacterioruberina (Kelly et al., 1970; Kushwaha et al., 1974; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995). Além desses carotenóides, a bactéria *Haloferax volcanii* produz isômeros de all-*trans*-bacterioruberina (57% do total de carotenóides), tais como 5-*cis*-bacterioruberina (19%), 9-*cis*-bacterioruberina (11%), 13-*cis*-bacterioruberina (10%), 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina (3%) e 9-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina (Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1992). As estruturas dos carotenóides estão apresentadas nas **Figuras 3 e 4**.

Ronnekleiv & Liaaen-Jensen (1995) e Ronnekleiv et al. (1995) verificaram que a *Haloferax volcanii* contém 0,04% de carotenóide por massa seca, os quais também consistem em carotenóides de cadeia longa com 50 carbonos, tais como, bacterioruberina (82% do total de carotenóides), monoanidrobacterioruberina (7%), bisanidrobacterioruberina (3%) e 3',4'-diidromonoanidrobacterioruberina (2%), além de carotenóides com cadeia menor, como 1% de 2-isopentenil-3,4-deidrorodopina (C₄₅) e 0,3% de licopeno (C₄₀). As estruturas químicas destes carotenóides estão apresentadas na **Figura 3**.

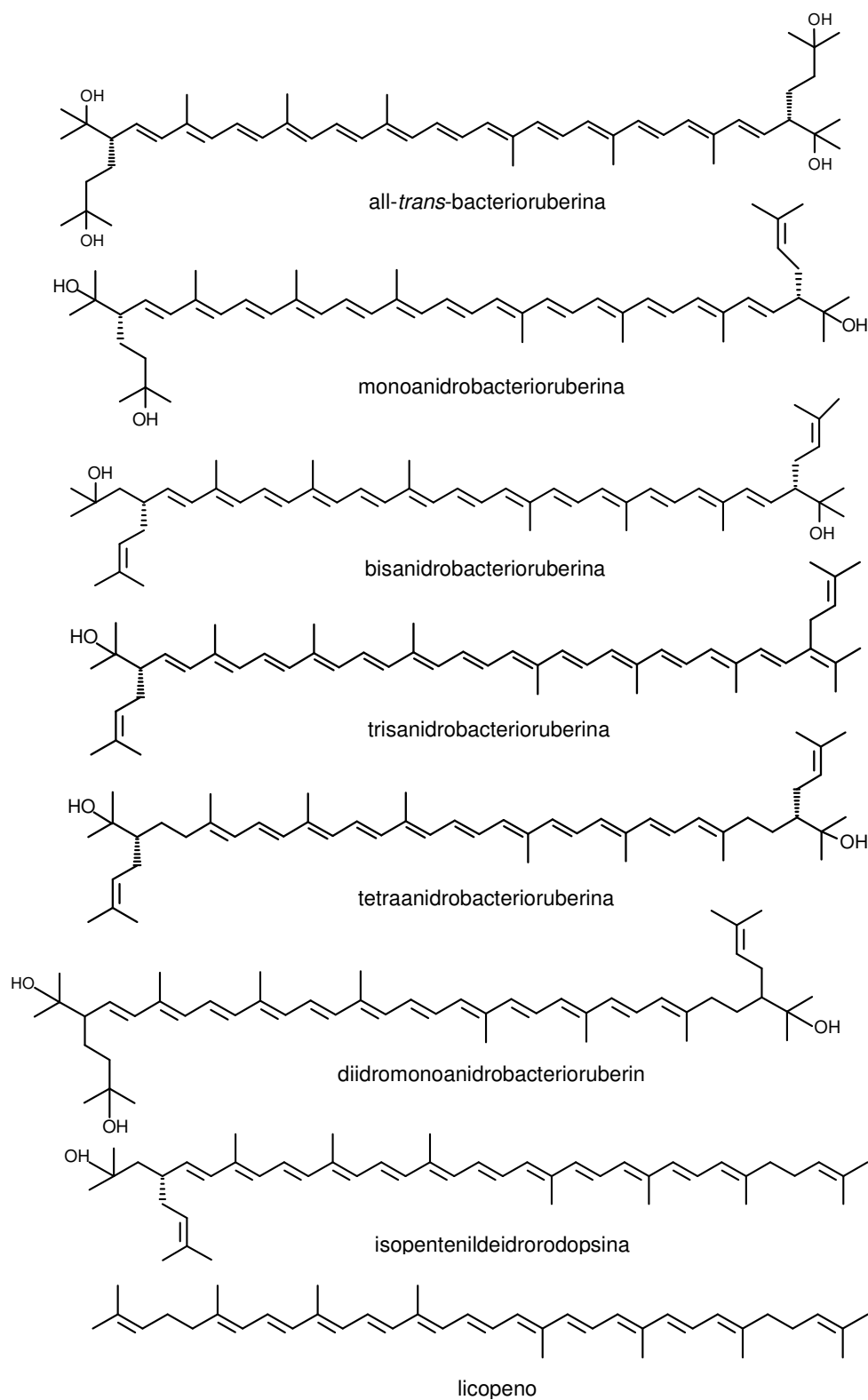


Figura 3. Estrutura química dos carotenóides detectados em *Halobacterium salinarium* e *Haloferax volcanii*.

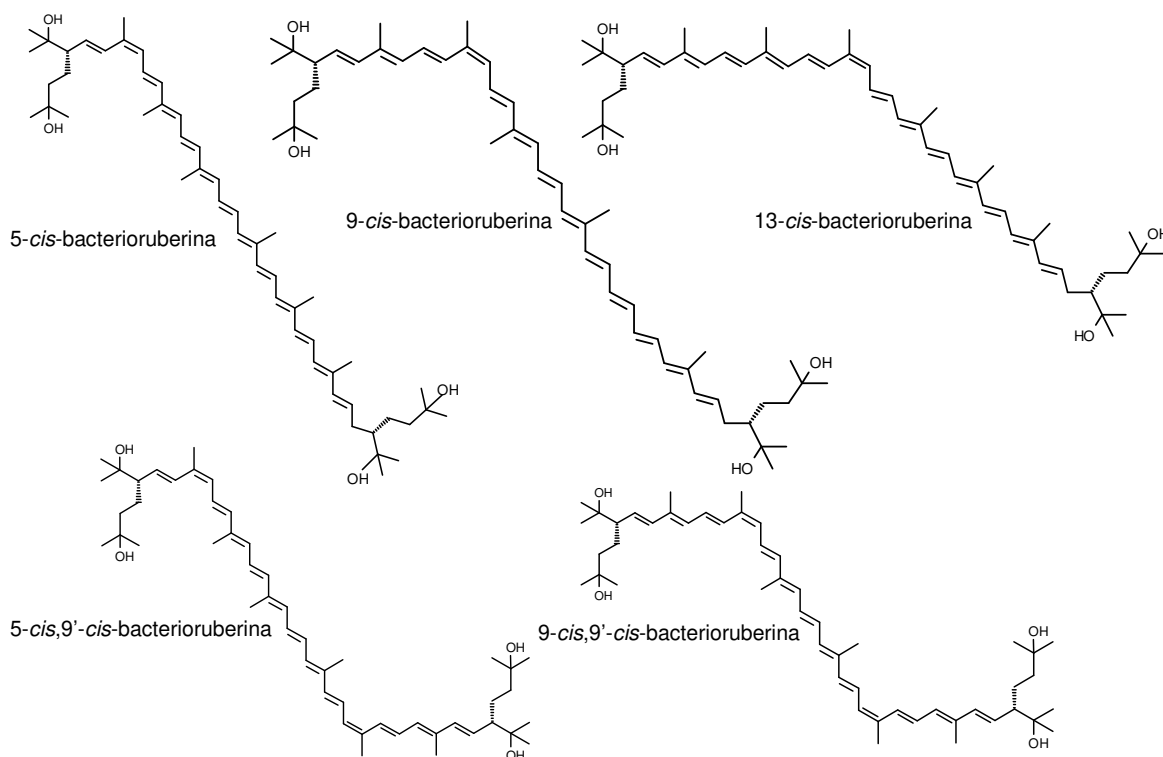


Figura 4. Estruturas dos isômeros geométricos *cis* da bacterioruberina.

Kelly et al. (1970) estudaram algumas linhagens de *Halobacterium salinarium* e observaram mais de 1% de carotenóides totais por massa seca, com predominância de carotenóides de cadeia longa com 50 carbonos, tais como bisanidrobacterioruberina (2%), monoanidrobacterioruberina (10%) e bacterioruberina (85%).

A biossíntese do carotenóide bacterioruberina e de seus derivados, proposta por Sumper et al. (1976) e Pfander (1994), ocorre a partir do licopeno, conforme a **Figura 5**.

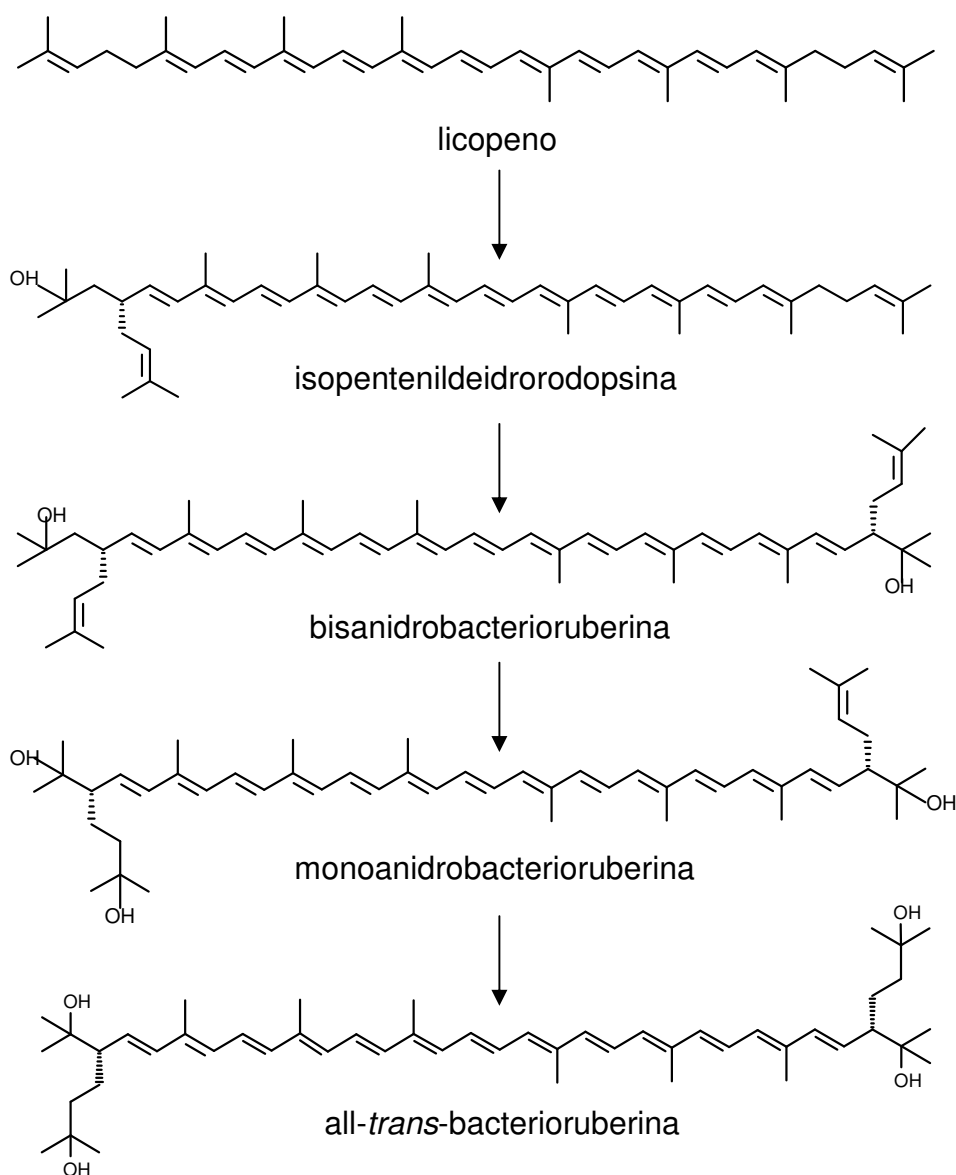


Figura 5. Biossíntese do carotenóide bacterioruberina e de seus derivados isolados de *Halobacterium salinarum*.

A bacterioruberina apresenta 13 ligações duplas conjugadas, sendo o carotenóide majoritário em algumas espécies de bactérias halófilas. Saito et al. (1997) observaram que a bacterioruberina possui maior habilidade de seqüestrar o radical hidroxila que o β -caroteno, pois apresenta maior número de ligações duplas conjugadas que o β -caroteno. Shahmohammadi et al. (1998) e Asgarani et al. (1999) verificaram que bacterioruberina e alta concentração de KCl intracelular

protegem as células de *Halobacterium salinarium* contra os efeitos letais dos agentes oxidativos ao DNA.

Bacterioruberinas, além de β -caroteno, foram também encontradas em bactérias extremamente halofílicas, isoladas a partir de solo salino no Egito (Asker & Ohta, 1999; Asker et al., 2002). Aparentemente, as bacterioruberinas estão envolvidas na proteção tanto de bactérias extremamente halófilas como as que crescem em baixas concentrações de sal contra os efeitos da luz solar, através da estabilização das membranas celulares (D'Souza et al., 1997; Shahmohammadi et al., 1998; Asker et al., 2002). A importância desses carotenóides na estabilização da membrana foi comprovada com o aumento na síntese de bacterioruberina quando *Haloferax mediterranei* foi submetida ao crescimento em concentrações mais baixas de sais (D'Souza et al., 1997).

Estes mesmos carotenóides de cadeia longa também foram acumulados em microrganismos psicotróficos, capazes de sobreviver a baixas temperaturas e altas incidências de luz UV, como o *Micrococcus roseus* e *Arthrobacter agilis*, isolados na Antártica (Chattopadhyay et al., 1997; Frong et al., 2001).

2.6 Fatores que exercem influência na produção biotecnológica de carotenóides

Fatores nutricionais e físicos, tais como natureza e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, minerais, pH, aeração, temperatura e luz possuem uma forte influência no crescimento celular, composição e produção de carotenóides por microrganismos (Britton, 1998). Sendo assim, os microrganismos acumulam vários tipos de carotenóides como resposta ao estresse causado pela variação desses fatores (Bhosale, 2004). A produção e o acúmulo de carotenóides são positivamente afetados pela irradiação de luz branca em algas, fungos e bactérias. Porém, a intensidade e a forma de iluminação variam de acordo com cada microrganismo. A teoria da foto indução pode ser descrita sob dois aspectos: no primeiro o efeito da luz sobre o crescimento do microrganismo exerce papel fundamental, como estimulante da produção; o segundo aspecto considera que o

acúmulo de carotenóides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenóides (Bhosale, 2004).

Melhorar a eficiência da biossíntese de carotenóides significa aumentar a produção. Juntamente com as condições de cultivo, a biossíntese de carotenóides é conduzida pelo nível e atividade das enzimas biossintéticas e o fluxo total de carbono do sistema sintetizante. Assim, uma alta produção pode ser alcançada alterando-se o nível e a atividade destas enzimas ou a via biossintética, pela utilização da abordagem molecular (Bhosale, 2004).

As melhores condições e composição do meio de cultivo devem ser determinadas para cada microrganismo individualmente (Britton, 1998). Além disso, deve-se considerar também os custos de produção nos processos fermentativos em grande escala. É interessante a utilização de resíduos ou subprodutos industriais como meio de cultivo, já que os componentes dos meios de cultura podem representar de 38 a 73% do custo total de produção (Villen, 2001).

A maioria dos estudos sobre as variáveis que influenciam no crescimento celular e na produção de carotenóides foi realizada com fungos filamentosos, leveduras e microalgas (Bhosale, 2004), principalmente relacionada com a produção de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* (Johnson & An, 1991; Orosa et al., 2005) e *Phaffia rhodozima* (Fontana et al., 1997; Parajó et al., 1998), e com a produção de β -caroteno por *Dunaliella* sp. (Vandamme, 1992; Orset & Young, 1999) e *Blakeslea trispora* (Feofilova, 1994).

Borowitzka et al. (1990) estudaram o efeito de diferentes concentrações de NaCl no acúmulo de carotenóides por *Dunaliella salina* e observaram um aumento no total de carotenóides, principalmente de β -caroteno. Nas concentrações de 10 e 20% de NaCl a porcentagem de luteína, em relação ao total de carotenóides, diminuiu e a de zeaxantina aumentou.

Squina et al. (2002) avaliaram a produção de carotenóides por duas linhagens de *Rhodotorula*, utilizando caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono, uma matéria-prima abundante e de baixo custo no Brasil, verificando a influência da ausência ou presença de peptona e da ausência ou suplementação

com soluções de sais inorgânicos no meio de cultura, através de um planejamento experimental fatorial fracionado.

Em relação aos carotenóides produzidos por bactérias extremamente halófilas, Asker & Ohta (1999) observaram que o aumento da concentração de oxigênio dissolvido e a adição de elementos traços (FeCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , CuSO_4) ao meio de cultivo favoreceu a produção destes pigmentos. Além disso, a maior produção de carotenóides e de biomassa ocorreu na temperatura de 37 °C, pH 7,2, 25% NaCl, 0,2% KCl e 4% MgSO_4 .

Larsen & Grant (1989) reportaram que *Halobacterium salinarium* pode crescer em condições anaeróbias na presença de luz, e no escuro na presença de arginina. Oren & Litchfield (1999) verificaram que apenas as linhagens de *Halobacterium salinarium* apresentaram crescimento nessas condições de cultivo, dentre as 18 linhagens de bactérias estudadas.

O efeito da luz sobre o crescimento e a produção de carotenóides por *Halobacterium salinarium* foi investigado por El-Sayed et al. (2002), demonstrando que a presença de luz foi essencial na biossíntese do carotenóide majoritário bacterioruberina, contribuindo para um aumento de 80% do total de carotenóides. Goodwin et al. (2006) também estudaram o crescimento e a produção de carotenóides por microcolônias da linhagem *Halobacterium salinarium*, sendo submetidas à luz fluorescente e luz solar durante o dia e ausência de luz durante a noite, temperatura de 45 °C por 7 dias de cultivo e , observaram que na ausência de luz as colônias cresceram mais lentamente.

Recentemente, Manikandan et al. (2009) estudaram a otimização do meio de cultivo de *Halobacterium salinarum* através da metodologia de superfície de resposta e observaram que a máxima concentração celular foi obtida com o meio de cultivo contendo 6,35 g/L de KCl, 9,70 g/L de MgSO_4 , 13,38 g/L de gelatina e 12 g/L de amido solúvel. A concentração de NaCl utilizada foi de 20%, temperatura de 50 °C e pH 7,2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

As linhagens *Halobacterium salinarium* (ATCC 33171) e *Halococcus morrhuae* (ATCC 17082) foram doadas pelo Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

As culturas liofilizadas foram reativadas em meio líquido Halobacterium (**Tabela 3**), a 37 °C por 7 dias. Em seguida, os microrganismos foram isolados por esgotamento em placas Petri contendo meio Halobacterium, seguido de coloração de Gram para verificar a pureza. As culturas foram estocadas em duplicata e armazenadas a -70 °C com glicerol, em freezer.

3.2 Meio de cultura e cultivo dos microrganismos

O meio de cultura Halobacterium (**Tabela 3**) foi preparado, homogeneizado por agitação em placa agitadora com auxílio de magneto, pH ajustado para 7,4 e esterilizado em autoclave a 120 °C, por 20 minutos a 1 atm.

O crescimento das linhagens *Halobacterium salinarium* e *Halococcus morrhuae* foi realizado em meio Halobacterium, temperatura de 37 °C, em shaker sob agitação de 200 rpm (Moore & McCarthy, 1969; Torreblanca et al., 1986).

Tabela 3. Composição do meio Halobacterium.

Meio Halobacterium	Quantidade (g)
Ácidos Casamínicos	7,5
Extrato de levedura	10,0
Na ₃ -citrato	3,0
KCl	2,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	20,0
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,05
MnSO ₄ . H ₂ O	0,2
NaCl	250,0
Agar (para meio sólido)	20,0
Água destilada	1000 mL

O cultivo das bactérias foi realizado em três fases sucessivas. Na primeira fase, o microrganismo foi transferido para placa Petri contendo meio Halobacterium e incubado a 37 °C durante 7 dias.

Na segunda fase, a de pré-inóculo, foram transferidas duas alçadas de cultura da placa Petri para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio Halobacterium, seguido de incubação a 37 °C em shaker, sob agitação de 200 rpm por 7 dias até atingir uma população de 10^9 células por mL. Na terceira fase realizou-se o preparo do inóculo em Erlenmeyers de 1000 mL contendo 400 mL de meio Halobacterium e 10% (v/v) de pré-inóculo, seguido de incubação a 37 °C em shaker a 200 rpm durante 7 dias.

3.3. Determinação de biomassa seca

Após o crescimento bacteriano nas condições descritas acima, a suspensão foi centrifugada a $23900 \times g$ por 10 min a 10 °C em centrífuga refrigerada (Sorval Instruments RC5C – Dupont®) e o sobrenadante descartado. A massa celular foi lavada com água salina, seguido de centrifugação. O pellet obtido foi congelado em placas a -35 °C para posterior liofilização e pesagem para quantificar a quantidade de biomassa seca produzida por litro de meio de cultura.

3.4 Determinação de carotenóides

3.4.1 Extração de carotenóides

A extração dos carotenóides a partir da massa celular liofilizada dos microrganismos foi realizada segundo adaptação do método abrasivo utilizado por Squina & Mercadante (2003).

As bactérias liofilizadas (300 mg) foram maceradas sucessivas vezes em almofariz com auxílio de um pistilo e esferas de vidro com diâmetro de 150-212 µm para rompimento da parede celular. Os carotenóides foram extraídos com acetato de etila, e os extratos de carotenóides foram centrifugados a $1100 \times g$ por 5 min para separação da biomassa e do extrato de carotenóides em acetato de etila e secos em N₂. Este procedimento foi repetido algumas vezes até a extração exaustiva dos carotenóides em acetato de etila. A seguir, os carotenóides foram

extraídos exaustivamente com metanol até que o solvente e as células permanecessem sem coloração. Posteriormente, os extratos de carotenóides foram combinados, filtrados em membrana de polietileno (Millipore) com poro de 0,22 μm , secos sob N_2 e mantidos em freezer a $-35\text{ }^\circ\text{C}$ sob atmosfera de nitrogênio.

3.4.2 Quantificação de carotenóides totais

A absorbância dos carotenóides solubilizados em metanol foi medida em espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent modelo 8453, Palo Alto, EUA) na faixa de 220 a 750 nm. A concentração total de carotenóides foi calculada através do valor obtido da absorbância a 486 nm. O coeficiente de absorvidade utilizado foi 2660, referente ao carotenóide majoritário bacterioruberina em metanol (Britton, 1995).

3.4.3 Separação e identificação de carotenóides por HPLC-PDA-MS/MS

Os carotenóides foram analisados em um equipamento de cromatografia líquido de alta eficiência (HPLC) constituído de um sistema de bombeamento binário LC-20AD (Shimadzu), com sistema de injeção “Rheodyne” de 20 μL , detectores de arranjo de diodo (PDA) (modelo SPD-M20A, Shimadzu) e de massas (MS/MS) (modelo Esquire 4000, da Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram: interface “atmospheric pressure chemical ionization” (APCI), operando no modo de ionização positivo; corrente na corona: 4000 nA; temperatura da fonte de $450\text{ }^\circ\text{C}$; gás de secagem utilizado foi N_2 a temperatura de $350\text{ }^\circ\text{C}$ e fluxo de 5 L/min; nebulizador a 60 psi e energia de fragmentação MS/MS de 1,4 V (De Rosso & Mercadante, 2007 a). Os espectros de massas foram adquiridos numa faixa de m/z de 100 a 1200, os espectros UV-visível obtidos entre 220 e 700 nm e os cromatogramas processados a 490 nm.

Os carotenóides foram separados em coluna de fase reversa C_{30} YMC (5 μm , 250 x 4,6 mm id) (Waters, Wilmington, EUA), utilizando como fase móvel um gradiente linear de MEOW (metanol)/TBME (éter metil *tert*-butilico) de 95:5

para 70:30 em 30 min, para 50:50 em 20 min, mantendo 50:50 por 10 min, para 40:60 em 2 min, mantendo esta proporção por 10 min, com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna mantida a 32 °C. Entre as corridas, a coluna foi recondicionada em 95:5 por 15 min.

A identificação dos carotenóides foi baseada na ordem de eluição dos compostos em coluna C₃₀, nas características dos espectros UV-visível (comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$), grau de estrutura fina (%III/II) e intensidade do pico *cis* (%A_B/A_{II})) comparados com dados disponíveis na literatura (Britton, 1995) e dos espectros de massas (íon molecular e fragmentos de massas) (Back & Enzell, 1995; Kelly et al., 1970; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995; Britton et al., 2004; De Rosso & Mercadante, 2007 a, b).

3.5. Determinação da atividade antioxidante

3.5.1 Atividade anti-radical livre

O radical ABTS^{•+} foi formado a partir da reação da solução aquosa de ABTS (7 mM) com a solução de persulfato de potássio (2,45 mM). As duas soluções foram misturadas e mantidas em repouso no escuro a temperatura ambiente por 12 a 16 horas, segundo o método de Re et al. (1999). Após este período, esta solução foi diluída em etanol até absorvância de 0,7 ($\pm 0,02$), medida a 734 nm. Os extratos de carotenóides foram diluídos em 1 mL de etanol:metanol (1:1) e diluído novamente em diferentes concentrações de carotenóides. Em 1,8 mL da solução etanólica ABTS^{•+} foram adicionados 200 μ L dos extratos diluídos ou de etanol: metanol (1:1) (controle) ou da solução padrão de Trolox em etanol, seguido de agitação. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm após 1 minuto e 10 minutos, porém para acompanhar a cinética de reação foram realizadas leituras a cada 5 segundos. A quantificação da atividade anti-radical foi realizada a partir de uma curva-padrão de Trolox (0,001–1,5 mM) e os resultados foram expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente de Trolox).

3.5.2 Atividade desativadora de $O_2(^1\Delta_g)$

Para a determinação do efeito protetor dos extratos de carotenóides sobre o $O_2(^1\Delta_g)$, as reações foram realizadas utilizando etanol: acetato de etila (1:1) como solvente, solução de 1 g/L de dimetil antraceno (DMA) como actinômetro e solução de azul de metileno (13 μ M) como sensibilizador, sob agitação moderada, atmosfera de ar e temperatura controlada a 20 ± 1 °C. A uma cubeta de 1,5 mL foi adicionado 880 μ L de azul de metileno, 20 μ L DMA e 100 μ L amostra ou etanol: acetato de etila. O sistema foi iluminado com uma lâmpada de filamento 150 W acoplada a um conjunto de filtros laranja e vermelho, permitindo a passagem de luz somente em comprimento de onda maior que 570 nm, excitando somente o sensibilizador. O sistema foi monitorado através da medida de absorbância da solução em um sistema integrado com um espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent) na faixa de 150 a 650 nm (De Rosso, 2006; Montenegro et al., 2004).

O efeito protetor que os extratos de carotenóides ofereceram ao actinômetro DMA foi calculado através da curva com ajuste de primeira ordem, Equação 1.

$$\% \text{proteção} = \frac{k_{obs}^{DMA} - k_{obs}^{DMA+CAR}}{k_{obs}^{DMA}} \times 100 \quad (1)$$

onde k_{obs}^{DMA} é constante de velocidade de degradação do DMA e $k_{obs}^{DMA+CAR}$ é a constante de velocidade de degradação do DMA na presença do extrato de carotenóides.

3.6 Planejamento fatorial para cultivo da *Halococcus morrhuae*

Em ensaios preliminares, segundo os itens 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5, a linhagem *Halococcus morrhuae* apresentou maior produção de biomassa, carotenóides totais e maior atividade antioxidante, portanto esta linhagem foi escolhida para avaliar a influência de alguns efeitos no crescimento, produção de carotenóides e atividade antioxidante, através de um planejamento fatorial completo.

3.6.1 Presença/ausência da luz no crescimento celular e na produção de carotenóides

Este teste foi realizado com o objetivo de verificar a influência da luz sobre o crescimento e a produção de carotenóides da linhagem *Halococcus morrhuae*, pois segundo El-Sayed et al. (2002) e Bhosale (2004) a luz é uma variável determinante na produção de biomassa e de carotenóides para bactérias halófilas.

As condições de cultivo foram as mesmas descritas no item 3.2. Porém, na terceira fase de cultivo um dos Erlenmeyers foi iluminado com lâmpada fluorescente com intensidade luminosa total de 295 lux (Philips-Lâmpada Flúor, F24/T12/CW- HO Coolwrite 24T12) e o outro foi protegido com papel alumínio, sendo ambos incubados a 37 °C em shaker a 200 rpm durante 7 dias. A massa celular obtida foi removida por centrifugação, lavada em solução salina (NaCl 25%), centrifugada e, posteriormente realizou-se a pesagem da massa celular úmida e após liofilização da mesma.

A biomassa seca foi pesada e cerca de 300 mg desta biomassa foi utilizada na extração dos carotenóides, conforme descrito no item 3.4.1 Em seguida foi realizada a leitura de carotenóides totais em espectrofotômetro UV-visível (item 3.4.2).

Com base nos dados obtidos pode-se comprovar que a luz aumentou o acúmulo de carotenóides nesta linhagem estudada. Portanto, a luz não foi utilizada no planejamento fatorial completo como uma variável, ou seja, todos os experimentos foram realizados com luz.

3.6.2 Cinética de crescimento nas fases de pré-inóculo e inóculo

A cinética de crescimento foi realizada para avaliar a possibilidade de reduzir o tempo de cultivo e obter alto crescimento celular e alta produção de carotenóides.

A cultura selecionada foi transferida para uma placa Petri contendo meio Halobacterium e incubada a 37 °C durante 7 dias. Em seguida foram transferidas duas alçadas da cultura para 4 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100

mL de meio Halobacterium cada, os quais foram incubados em shaker a 37 °C e 200 rpm. A partir do quarto dia de cultivo, um Erlenmeyer foi retirado por dia e a biomassa proveniente foi removida por centrifugação, lavada em solução salina (NaCl 25%), centrifugada novamente e posteriormente a massa celular úmida foi pesada, congelada a -35 °C e liofilizada. Este procedimento foi realizado até o sétimo dia de cultivo.

A partir dos resultados obtidos pode-se observar um maior crescimento celular e maior produção de carotenóides no sétimo dia de cultivo, portanto o planejamento foi realizado com incubação da bactéria durante 7 dias de cultivo.

3.6.3 Variáveis do planejamento fatorial

O planejamento fatorial foi realizado para avaliar o efeito da composição do meio de cultura e da temperatura de cultivo sobre o crescimento celular (g massa celular seca/L de meio de cultura), a produção de carotenóides (µg/g massa celular seca) e atividade desativadora de oxigênio singlete (porcentagem de proteção) pelo extrato de carotenóides da bactéria *Halococcus morrhuae*. Os valores dos níveis de cada uma das variáveis estudadas (**Tabela 4**) foram estabelecidos através de testes preliminares e de dados da literatura sobre o cultivo de bactérias extremófilas (item 2.3).

Foi empregado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , com pontos axiais e três pontos centrais totalizando 17 ensaios conduzidos aleatoriamente (**Tabela 5**) (Box et al., 1978). As variáveis independentes estudadas foram: concentração de NaCl (g/L), pH e temperatura (°C). Os inóculos foram incubados em shaker iluminado com lâmpada fluorescente com intensidade luminosa de 295 lux (Philips - Lâmpada Flúor: F24/T12/CW- HO Coolwrite 24T12). As respostas (variáveis dependentes) estudadas foram: crescimento celular (g massa celular seca/L de meio de cultura), produção de carotenóides (µg/g massa celular seca) e atividade desativadora de oxigênio singlete (% proteção).

Tabela 4. Variáveis e valores utilizados nos níveis do delineamento composto central rotacional para cultivo da bactéria halófila.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		Ponto axial	Nível	Ponto	Nível	Ponto axial
		Inferior (-1,68)	inferior (-1)	central (0)	superior (+1)	superior (+1,68)
NaCl (g/L)	X ₁	200	229,76	250	279,76	300
pH	X ₂	6,0	6,4	7,0	7,6	8,0
Temperatura (°C)	X ₃	30	34,05*	40	45,95*	50

* Temperaturas ajustadas: 34 °C e 46 °C

Tabela 5. Valores codificados da matriz do delineamento composto central rotacional 2³ com pontos axiais e 3 pontos centrais para cultivo da bactéria *Halococcus morrhuae*.

Ensaio	Variáveis Independentes*		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

* X₁ = NaCl (g/L), X₂ = pH; X₃ = Temperatura (°C)

3.7 Análise estatística dos dados

Os dados experimentais obtidos no DCCR foram analisados com auxílio do módulo “Experimental Design” do programa Statistica 9.0 (STATSOFT, 2009) para determinar o efeito tanto das variáveis quanto das interações entre elas sobre as respostas em relação ao crescimento celular, produção de carotenóides e capacidade desativadora de $O_2(^1\Delta_g)$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Carotenóides produzidos pelas bactérias *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarium*

Os carotenóides foram identificados com base no conjunto de informações provenientes da ordem de eluição em coluna C_{30} , características dos espectros UV-visível ($\lambda_{m\acute{a}x}$, estrutura fina e intensidade do pico *cis*) e de massas. A indicação do fragmento referente à molécula protonada foi confirmada pelas fragmentações observadas nos espectros MS/MS.

O perfil dos carotenóides identificados foi semelhante para as linhagens *Hcc. morrhuae* e *Hbt salinarium*, apresentando como carotenóide majoritário a all-*trans*-bacterioruberina (**Figuras 6 e 7**). Foram também identificados 2 carotenóides minoritários (bisanidrobacterioruberina e trisanidrobacterioruberina), bem como 3 isômeros geométricos derivados da all-*trans*-bacterioruberina (13-*cis*-bacterioruberina, 5-*cis*-bacterioruberina e 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina), 2 isômeros *cis* derivados da all-*trans*-bisanidrobacterioruberina e 1 isômero *cis*-trisanidrobacterioruberina em *Hcc. morrhuae* e *Hbt salinarium*. O carotenóide all-*trans*-trisanidrobacterioruberina foi identificado apenas em *Hcc. morrhuae*. Foram também separados 7 picos não identificados. A identidade dos picos e algumas características encontram-se na **Tabela 6**, enquanto que as **Figuras 8 a 12** apresentam as estruturas químicas, os espectros UV-visível e de massas dos carotenóides identificados.

A partir da via biossintética do carotenóide bacterioruberina (**Figura 5**), foram identificados apenas os carotenóides bacterioruberina e bisanidrobacterioruberina. Mesmo através da técnica para extração de íon do

cromatograma (EIC), não foi possível encontrar a molécula protonada dos carotenóides isopentenildeidrorodopsina $[M+H^+] = 620$, tetraanidrobacterioruberina $[M+H^+] = 668$, monoanidrobacterioruberina $[M+H^+] = 722$ e diidromonoanidrobacterioruberina $[M+H^+] = 724$.

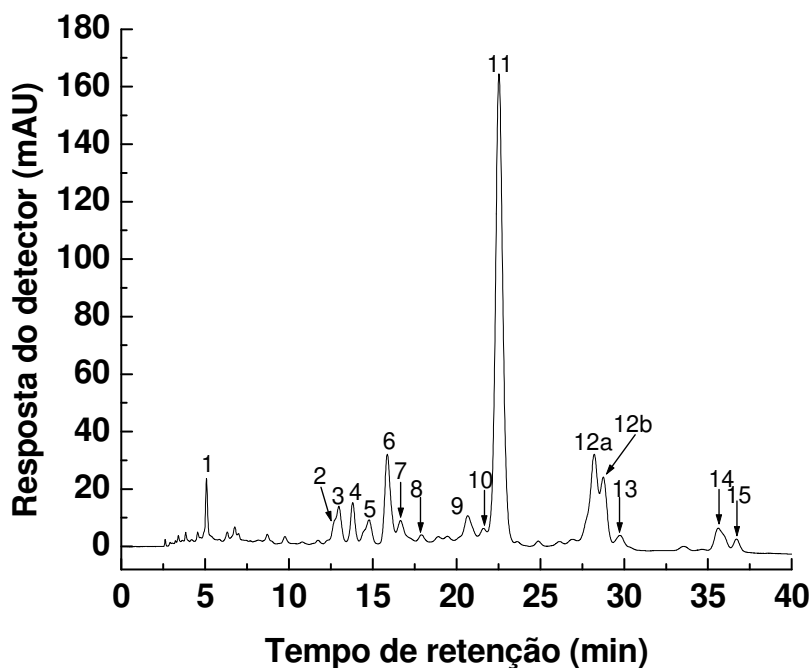


Figura 6. Cromatograma, processado a 490 nm, obtido por HPLC-PDA-MS/MS, dos carotenóides de *Halococcus morrhuae*. As condições cromatográficas estão descritas no item 3.4.3. A identificação e a caracterização dos picos estão apresentadas na **Tabela 6**.

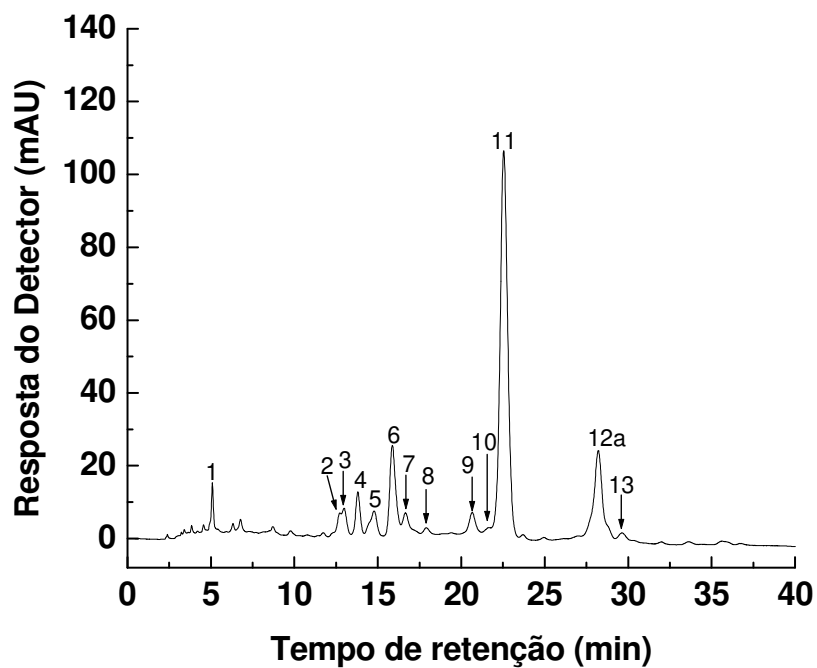


Figura 7. Cromatograma, processado a 490 nm, obtido por HPLC-PDA-MS/MS, dos carotenóides de *Halobacterium salinarium*. As condições cromatográficas estão descritas no item 3.4.3. A identificação e a caracterização dos picos estão apresentadas na **Tabela 6**.

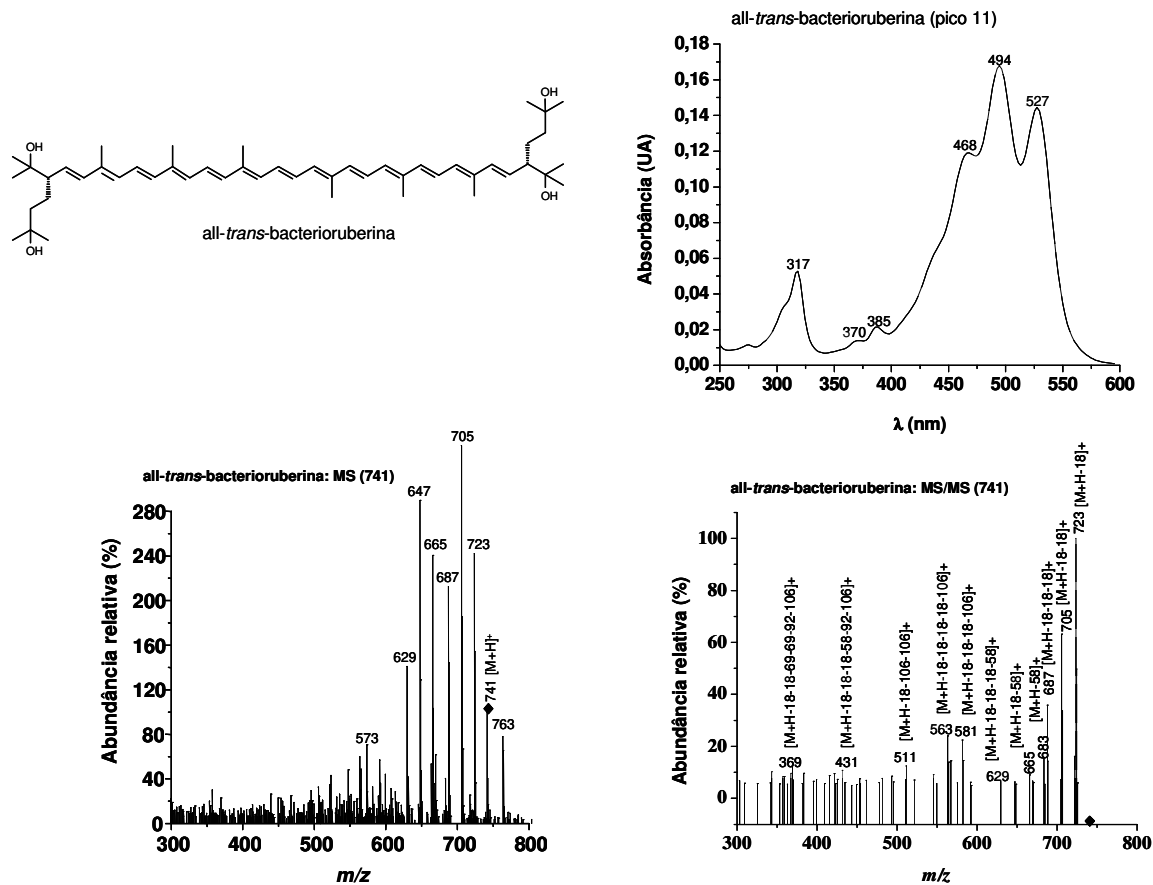


Figura 8. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do carotenóide all-*trans*-bacterioruberina (pico 11). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

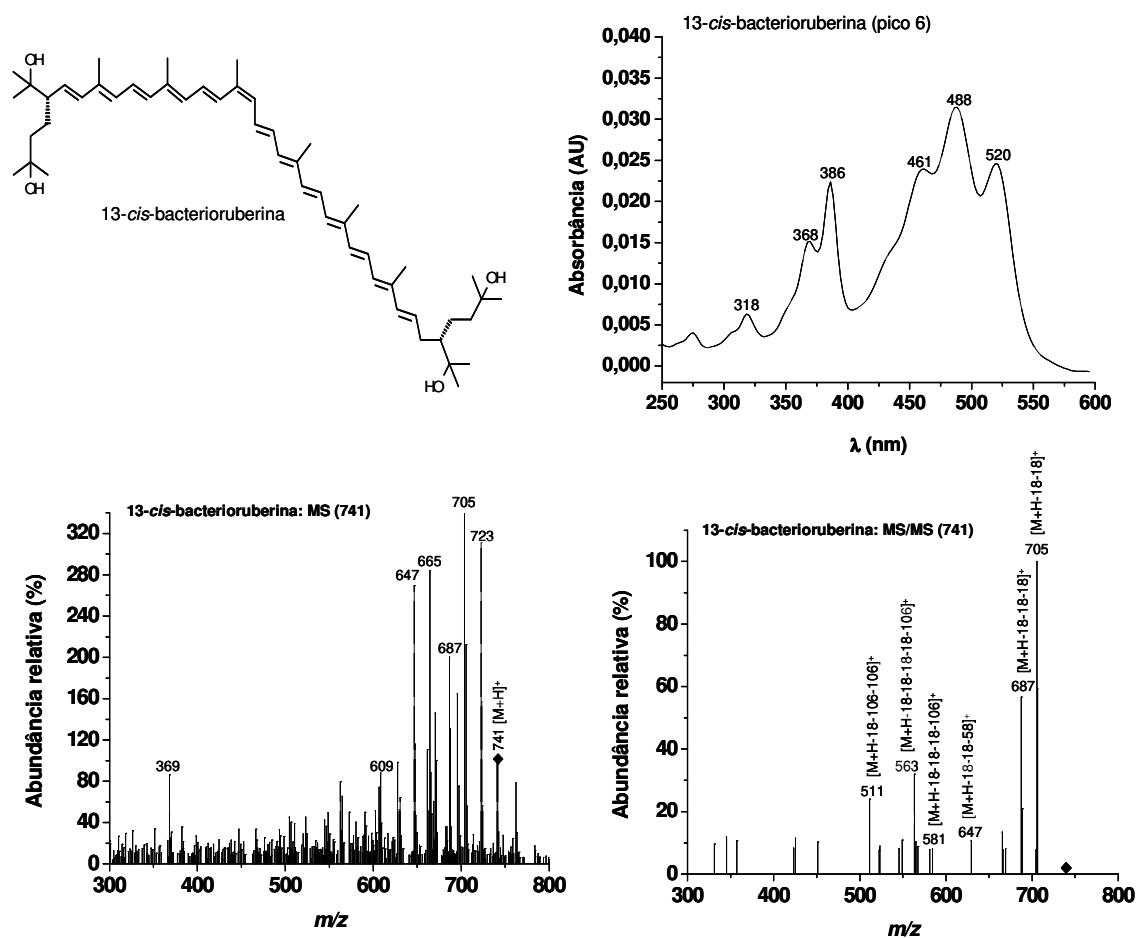


Figura 9. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do isômero 13-*cis*-bacterioruberina (pico 6). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

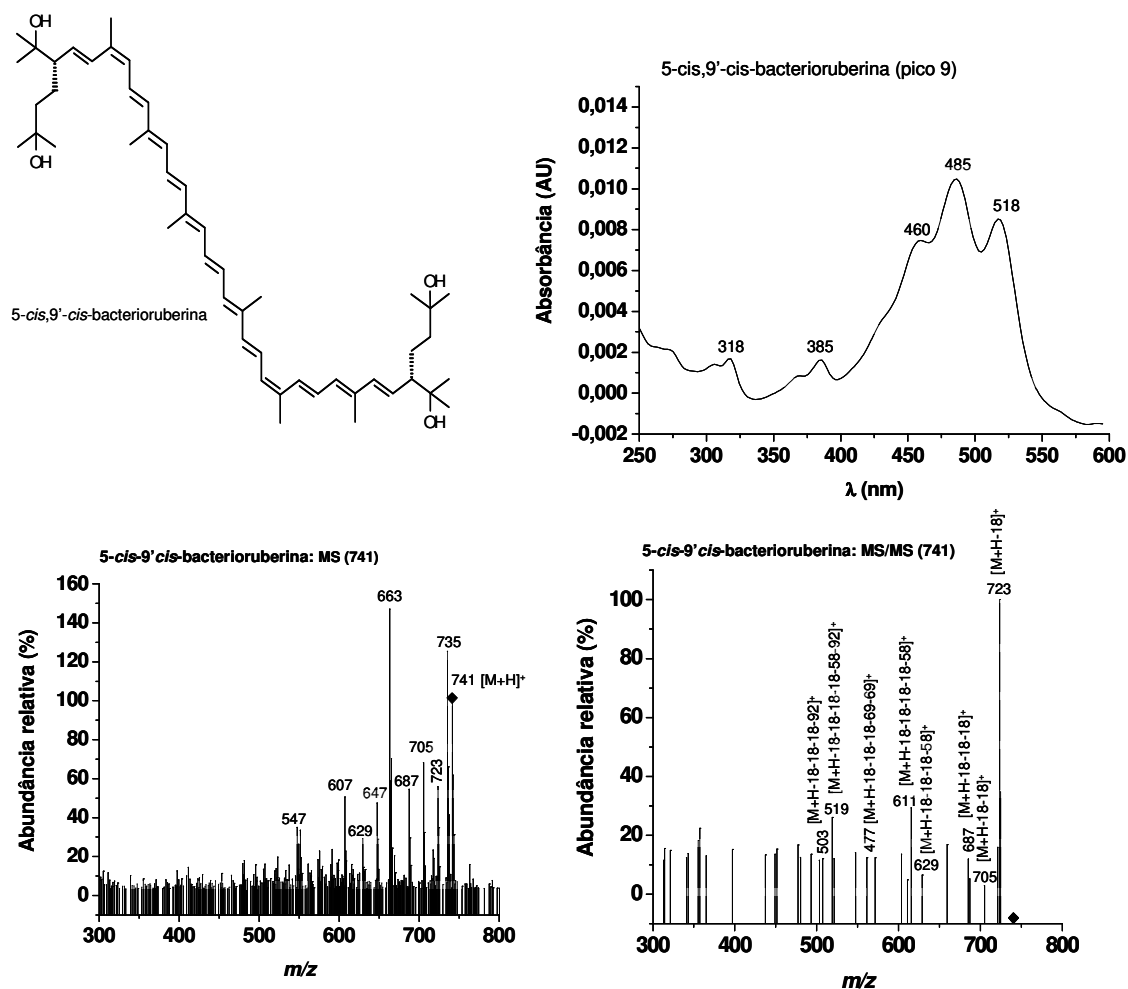


Figura 10. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do isômero 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina (pico 9). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

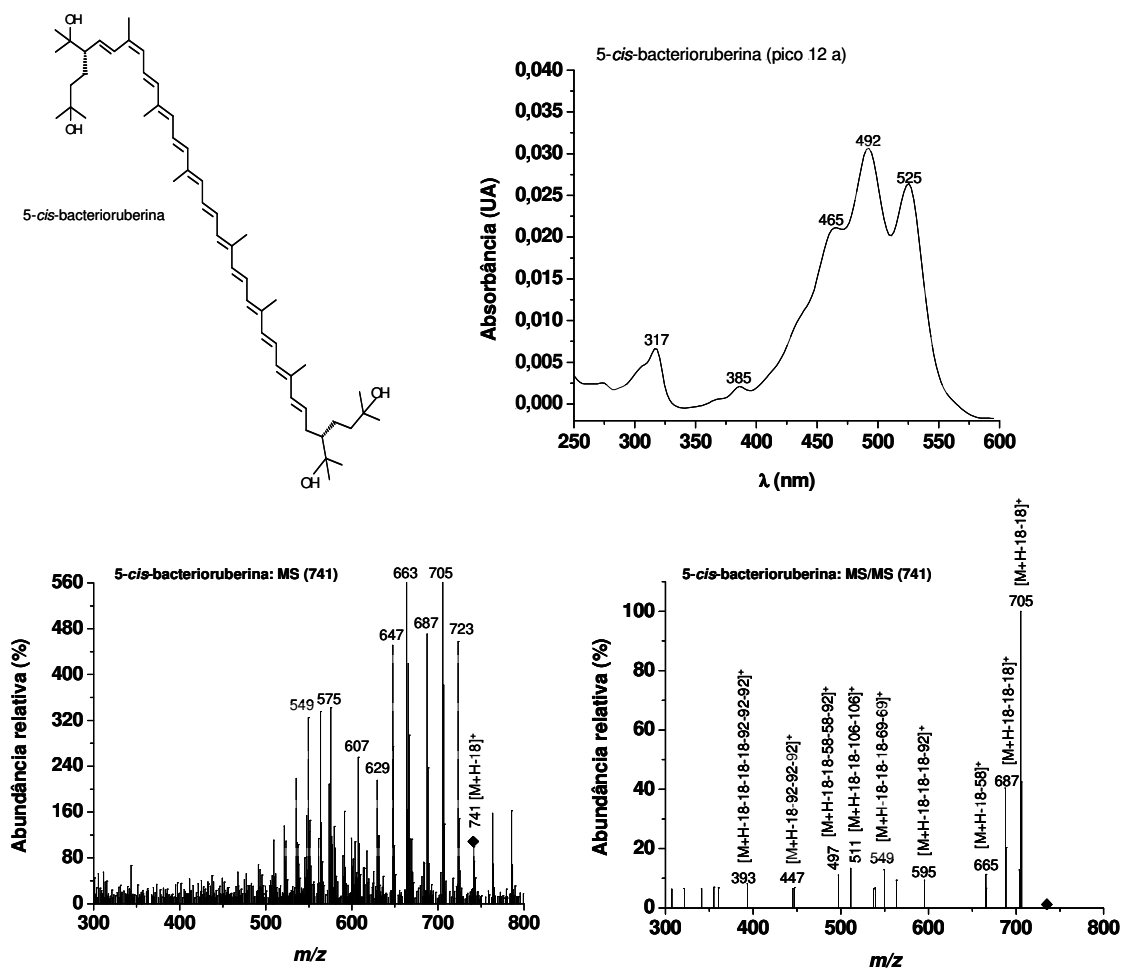


Figura 11. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do isômero 5-*cis*-bacterioruberina (pico 12a). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

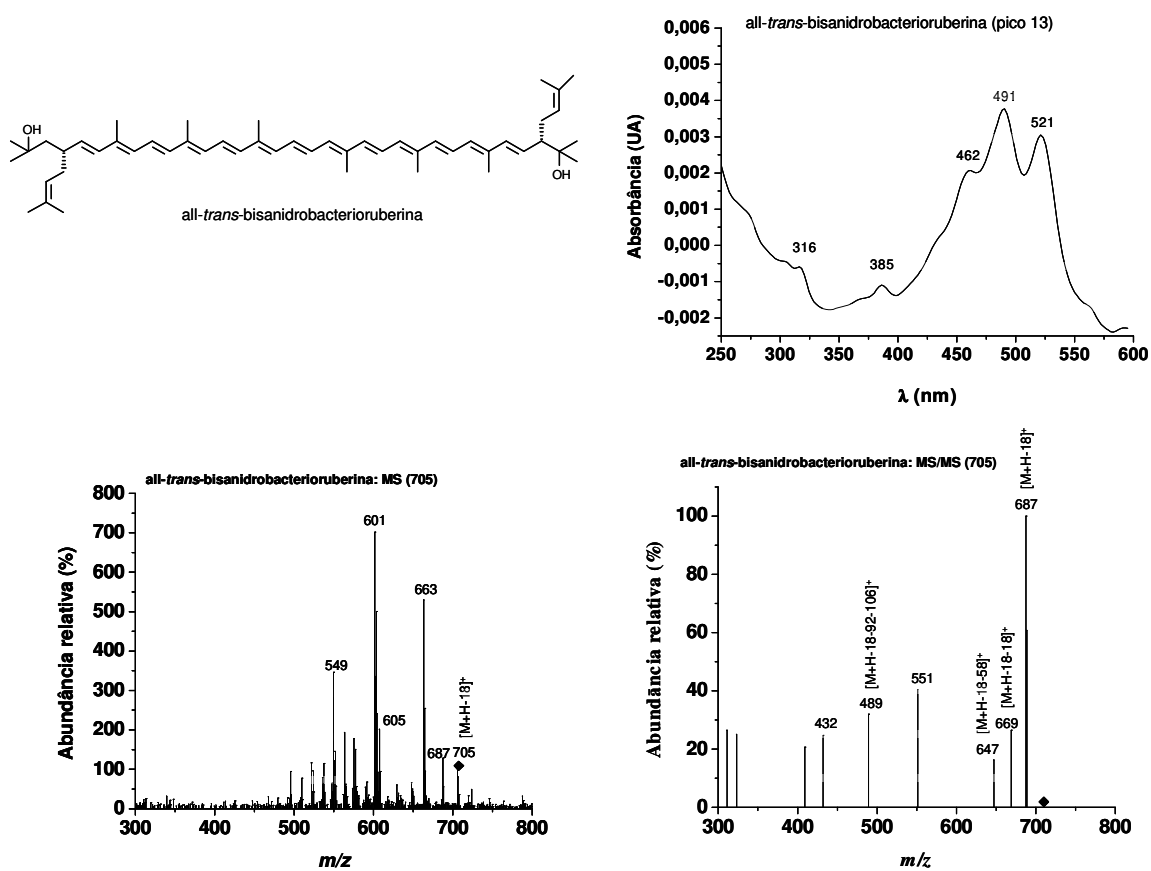


Figura 12. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do carotenóide *all-trans*-bisanidrobacterioruberina (pico 13). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

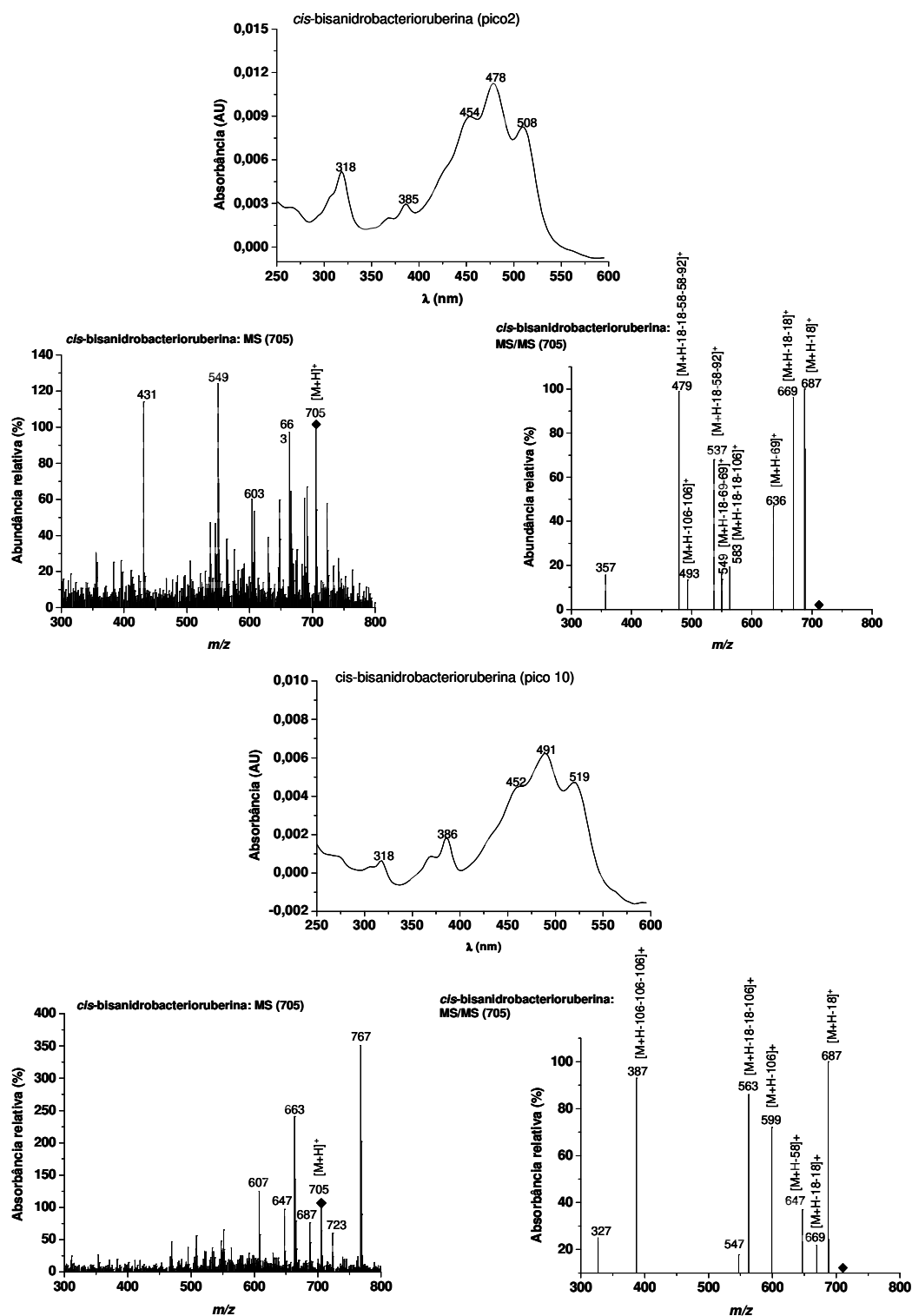


Figura 13. Espectros UV-visível e de massas dos isômeros *cis* da bisanidrobacterioruberina (picos 2 e 10). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

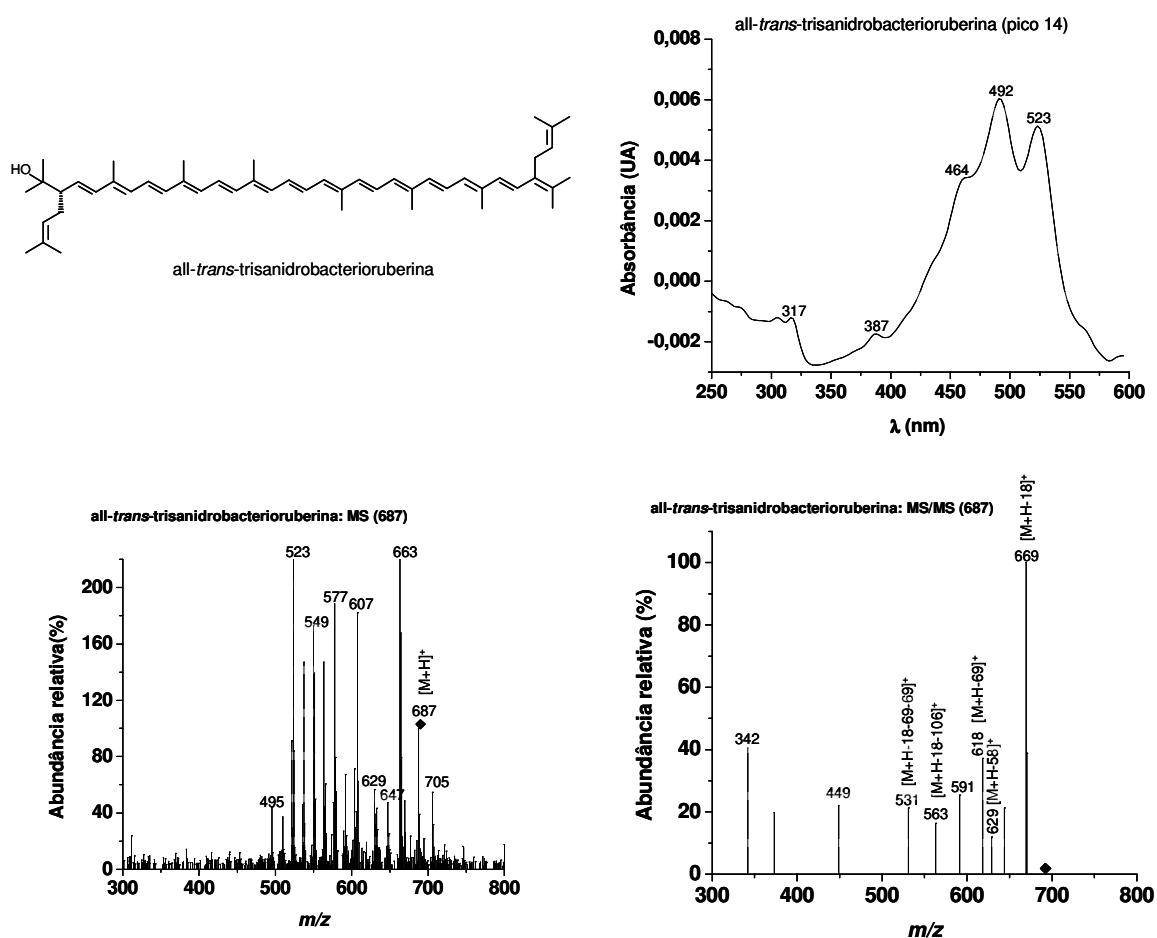


Figura 14. Estrutura química, espectros UV-visível e de massas do carotenóide *all-trans*-trisanidrobacterioruberina (pico 14). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

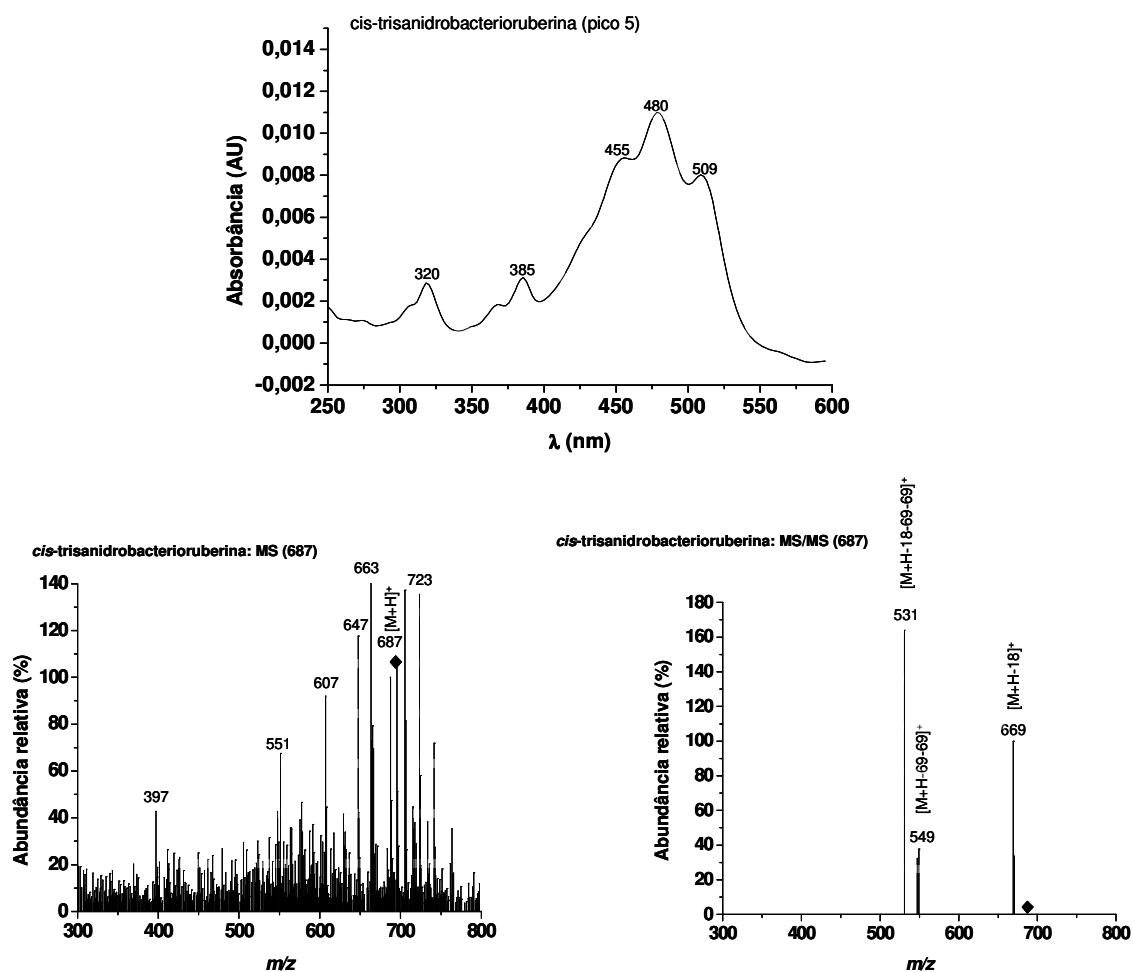


Figura 15. Espetros UV-visível e de massas do isômero cis da trisanidrobacterioruberina (pico 5). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico.

Tabela 6. Características dos carotenóides, obtidas por HPLC-PDA-MS/MS, produzidos por *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarum*.

pico ^a	carotenóide	t _R ^b (min)	λ _{max} ^c (nm)	% III/II	% A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS fragmentação dos íons (m/z)
1	não identificado	5,1	444-446	0	0	nd ^e	nd
2	<i>cis</i> -bisanidrobacterioruberina	12,7	368, 385, 454, 478-479, 508-510	27	31	705	687 [M+H-18], 669[M+H-18-18], 636 [M+H-69], 583 [M+H-18-18-106], 549 [M+H-18-69-69], 531 [M+H-58-58-58], 537 [M+H-18-58-92], 493 [M+H-106-106], 479 [M+H-18-58-58-92]
3	não identificado	13,0	368, 476	0	0	nd	nd
4	não identificado	13,8	430, 458, 482-486	20	0	705	687 [M+H-18], 669 [M+H-18-18], 577 [M+H-18-18-92], 567 [M+H-69-69], 509 [M+H-58-69-69], 469 [M+H-18-18-18-58-106], 453 [M+H-18-18-18-92-106], 425 [M+H-58-58-58-106], 411[M+H-18-92-92-92]
5	<i>cis</i> -trisanidrobacterioruberina	14,8	365-368, 385, 455, 479-480, 509	9-10	31-34	687	669 [M+H-18], 531 [M+H-18-69-69], 549 [M+H-69-69]
6	13- <i>cis</i> -bacterioruberina	15,8-15,9	368, 386, 461, 488, 520	33	71-72	741	723 ^d , 705 [M+H-18-18], 687 [M+H-18-18-18], 669 [M+H-18-18-18-18], 647 [M+H-18-18-58], 581 [M+H-18-18-18-106], 563 [M+H-18-18-18-18-106], 511 [M+H-106-106-18]. 495 [M+H-18-18-18-58-58-58], 453 [M+H-18-58-106-106], 425 [M+H-18-18-58-58-58-106], 371 [M+H-18-18-58-92-92-92]
7	não identificado	16,6	368, 384, 452, 481-482, 512-514	11	46	nd	nd
8	não identificado	17,9	385-386, 482, 491, 525	67	26-32	nd	nd
9	5- <i>cis</i> ,9'- <i>cis</i> -bacterioruberina	20,7	370, 385, 460, 485, 518	50	20-29	741	723 [M+H-18], 705 [M+H-18-18], 687 [M+H-18-18-18], 683 [M+H-58], 672 [M+H-69], 665 [M+H-18-58], 629 [M+H-18-18-58], 611 [M+H-18-18-18-58], 595 [M+H-18-18-92], 591 [M+H-92-58], 567 [M+H-18-18-69-69], 529 [M+H-106-106], 519 [M+H-18-18-18-58-92], 503 [M+H-18-18-18-92], 493 [M+H-18-18-106-106], 477 [M+H-18-18-18-69-69], 456 [M+H-18-69-92-106]
10	<i>cis</i> -bisanidrobacterioruberina	21,6	371, 386, 452, 491, 519-521	22	43	705	687 [M+H-18], 669 [M+H-18-18], 647 [M+H-58], 599 [M+H-106], 577 [M+H-18-18-92], 563 [M+H-18-18-106], 387 [M+H-106-106-106]
11	<i>all-trans</i> -bacterioruberina	22,5	370, 385, 468, 494, 527	58	9-11	741	723 [M+H-18], 705 [M+H-18-18], 687 [M+H-18-18-18], 683 [M+H-58], 665 [M+H-18-58], 629 [M+H-18-18-18-58], 631 [M+H-18-92], 581 [M+H-18-18-18-106], 563 [M+H-18-18-18-18-106], 545 [M+H-58-69-69], 511 [M+H-18-106-106], 443 [M+H-18-58-58-58-106], 431 [M+H-106-92-58-18-18-18], 369 [M+H-106-92-69-69-18-18]

^aNumeração de acordo com os cromatogramas das **Figuras 6 e 7**. ^bTempo de retenção de 3 corridas na coluna C₃₀. ^cGradiente linear de metanol/TBME. ^dFragmentação na fonte. ^eNão detectado.

Tabela 6. Continuação

pico ^a	carotenóide	t _R ^b (min)	λ _{max} ^c (nm)	% III/II	% A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS fragmentação dos íons (m/z)
12a	5- <i>cis</i> -bacterioruberina	28,2	385, 465, 492, 525	58-64	9-11	741	723 ^d , 705 [M+H-18-18], 687 [M+H-18-18-18], 669 [M+H-18-18-18], 665 [M+H-18-58], 647 [M+H-18-18-58], 595 [M+H-92-18-18-18], 563 [M+H-18-18-18-18-106], 549 [M+H-69-69-18-18-18], 545 [M+H-58-69-69], 511 [M+H-18-106-106], 497 [M+H-18-18-58-58-92], 447 [M+H-18-92-92-92], 397 [M+H-18-18-92-92-106], 393 [M+H-92-92-92-18-18-18-18]
12b	não identificado	28,7	385, 469, 494, 469, 527	50	14,3	669	638 [M+H-31], 600 [M+H-69], 531 [M+H-69-69], 393 [M+H-92-92-92]
13	<i>all-trans</i> -bisanidrobacterioruberina	29,7	385, 456-462, 482, 491-492, 521-522	55-86	20	705	687 [M+H -18], 669 [M+H-18-18], 647 [M+H-58], 563 [M+H-18-18-106], 489 [M+H-106-92-18]
14	<i>all-trans</i> -trisanidrobacterioruberina	35,6	387, 464, 492, 523	60	11	687	669 [M+H-18], 629 [M+H-58], 618 [M+H-69], 563 [M+H-106-18], 531 [M+H-69-69-18]
15	não identificado	36,7	388, 472, 496, 529	60	9	nd	nd

^aNumeração de acordo com os cromatogramas das **Figuras 6 e 7**. ^bTempo de retenção de 3 corridas na coluna C₃₀. ^cGradiente linear de metanol/TBME. ^dFragmentação na fonte. ^eNão detectado.

O pico 11 foi identificado como all-*trans*-bacterioruberina, pois as características dos espectros UV-visível e de massas foram semelhantes aos dados encontrados na literatura (Kelly et al.,1970; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1992; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995). O λ_{max} indica um cromóforo de 13 ligações duplas conjugadas, molécula protonada ($[M+H]^+$) a m/z 741 e fragmentos de massas com perda de quatro grupos hidroxila ($[M+H-18-18-18-18]$), perda de fragmentos com 58 u (C_4H_{10}) e 69 u (C_5H_{10}) provenientes dos grupos terminais, e com 92 u (tolueno) e 106 u (xileno) da cadeia poliênica.

Os picos 6, 9 e 12 foram identificados como isômeros geométricos *cis* da all-*trans*-bacterioruberina: 13-*cis*-bacterioruberina, 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina e 5-*cis*-bacterioruberina, respectivamente, pois apresentaram espectros UV-visível com características hipsocrômicas, menor estrutura fina espectral e maior intensidade no pico *cis* em comparação ao isômero *trans* (Tabela 6). O pico *cis* do isômero 13-*cis*-bacterioruberina apresentou maior intensidade ($\%A_B/A_{II} = 72$) que o pico *cis* do isômero 5-*cis*,9'-bacterioruberina ($\%A_B/A_{II} = 29$) e o pico *cis* do isômero 5-*cis*-bacterioruberina apresentou menor intensidade ($\%A_B/A_{II} = 11$) que os isômeros 13-*cis*-bacterioruberina e 5-*cis*,9'-bacterioruberina. Como esperado, todos esses isômeros apresentaram molécula protonada ($[M+H]^+$) a m/z 741 e fragmentos de massas com perda de quatro grupos hidroxila ($[M+H-18-18-18-18]$), perda de fragmentos com 58 u (C_4H_{10}), 69 u (C_5H_{10}), 92 u (tolueno) e 106 u (xileno), os dois últimos provenientes da cadeia poliênica. Todos esses dados foram semelhantes aos encontrados na literatura (Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1992).

O pico 13 foi identificado como all-*trans*-bisanidrobacterioruberina, pois as características do espectro UV-visível e de massas foram semelhantes aos dados encontrados na literatura (Kelly et al.,1970; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1992; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995). O λ_{max} indica um cromóforo de 13 ligações duplas conjugadas, molécula protonada ($[M+H]^+$) a m/z 705 e fragmentos de massas com perda de dois grupos hidroxila ($[M+H-18-18]$), perda de fragmentos com 58 u (C_4H_{10}), 92 u (tolueno) e 106 u (xileno).

Os picos 2 e 10 foram identificados como isômeros geométricos *cis* da bisanidrobacterioruberina, pois apresentaram espectros UV-visível com características hipsocrômicas, menor estrutura fina espectral e maior intensidade no pico *cis* em comparação com o isômero *trans* (Tabela 6). Como esperado, todos esses isômeros apresentaram molécula protonada ($[M+H]^+$) a m/z 705 e fragmentos de massas com perda de dois grupos hidroxila ($[M+H-18-18]$), perda de fragmentos com 58 u (C_4H_{10}), 92 u (tolueno) e 106 u (xileno).

O pico 14 foi identificado como all-*trans*-trisanidrobacterioruberina, pois as características do espectro UV-visível e de massas foram semelhantes aos dados relatados na literatura (Kelly et al., 1970; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995; Britton et al., 2004). O λ_{max} indica um cromóforo de 14 ligações duplas conjugadas, molécula protonada ($[M+H]^+$) a m/z 687 e fragmentos de massas com perda de um grupo hidroxila ($[M+H-18]$), e perdas de fragmentos com 58 u (C_4H_{10}), 69 u (C_5H_{10}) e 106 u (xileno).

O pico 5 foi identificado como um isômero geométrico *cis* da trisanidrobacterioruberina, pois apresentou espectro UV-visível com características hipsocrômicas, menor estrutura fina espectral e maior intensidade no pico *cis* em comparação ao isômero *trans*. Esse isômero apresentou molécula protonada ($[M+H]^+$) a m/z 687 e fragmentos de massas com perda de um grupo hidroxila ($[M+H-18]$), perdas de fragmentos com 58 u (C_4H_{10}), 92 u (tolueno) e 106 u (xileno).

Os picos 1, 3, 4, 7, 8, 12 b e 15 não foram identificados.

4.2 Biomassa, carotenóides totais e atividade antioxidante das bactérias *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarium*

A porcentagem relativa de área dos carotenóides de *Hcc. morrhuae* e *Hbt salinarium* separados por HPLC-PDA-MS/MS está apresentada na **Tabela 7**.

O carotenóide majoritário all-*trans*-bacterioruberina apresentou porcentagens relativas de 51% na linhagem *Hcc. morrhuae* e 57% na *Hbt. salinarium*. Estas porcentagens foram semelhantes à encontrada na bactéria *Haloferax volcanii* (57% de all-*trans*-bacterioruberina) pelos autores Ronnekleiv &

Liaaen-Jensen (1992), porém foram menores que as obtidas em alguns estudos realizados com as bactérias *Hbt. salinarium* e *Haloferax volcanii*, os quais apresentaram porcentagem ao redor de 82-85% de bacterioruberina (Kelly et al., 1970; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995) em condições aeróbicas de crescimento, 33 °C por 7 dias.

Tabela 7. Porcentagem relativa de área dos carotenóides de *Hcc. morrhuae* e *Hbt salinarium* separados por HPLC-PDA-MS/MS.

Pico	Carotenóide	% área	
		<i>Hcc. morrhuae</i>	<i>Hbt. salinarium</i>
1	não identificado	2,7	2,8
2	<i>cis</i> -bisanidrobacterioruberina	1,2	1,9
3	não identificado	2,1	2,7
4	não identificado	2,5	4,0
5	<i>cis</i> -trisanidrobacterioruberina	2,4	3,5
6	13- <i>cis</i> -bacterioruberina	7,8	10,5
7	não identificado	2,6	3,2
8	não identificado	0,6	0,5
9	5- <i>cis</i> ,9'- <i>cis</i> -bacterioruberina	3,3	3,1
10	<i>cis</i> -bisanidrobacterioruberina	1,3	0,1
11	all- <i>trans</i> -bacterioruberina	51,2	56,6
12a	5- <i>cis</i> -bacterioruberina	11,7	10,5
12b	não identificado	6,6	nd
13	all- <i>trans</i> - bisanidrobacterioruberina	1,2	0,6
14	all- <i>trans</i> - trisanidrobacterioruberina	2,3	nd
15	não identificado	0,5	nd

nd: não detectado.

Os isômeros geométricos derivados de bacterioruberina em *Hcc. morrhuae* e *Hbt salinarium*, respectivamente: 13-*cis*-bacterioruberina (7,8 e 10,5%) e 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina (3% em ambas) apresentaram porcentagens semelhantes às encontradas por Ronnekleiv & Liaaen-Jensen (1992) em *Haloferax volcanii*, os quais apresentaram, respectivamente, porcentagens de 10 e 3%. Já o isômero 5-*cis*-bacterioruberina (12 e 10,5%) apresentou menores porcentagens que as relatadas por Ronnekleiv & Liaaen-Jensen (1992), de 17%.

O carotenóide all-*trans*-bisanidrobacterioruberina apresentou porcentagens de 1,2% na linhagem *Hcc. morrhuae* e 0,56% na *Hbt. salinarium*, sendo porém menores que as encontradas por Kelly et al. (1970) em *Hbt. salinarium*, os quais apresentaram 2% de all-*trans*-bisanidrobacterioruberina e por Ronnekleiv & Liaaen-Jensen (1995) em *Haloferax volcanii*, os quais apresentaram porcentagem de 3%. Na literatura não foi encontrado porcentagem do carotenóide all-*trans*-trisanidrobacterioruberina (2,3%) em estudos realizados com as bactérias *Hbt. salinarium* e *Haloferax volcani*.

Diversos estudos realizados com as bactérias *Halobacterium salinarium* e *Haloferax volcanii* não apresentaram o teor de carotenóides totais, mas apenas as porcentagens de cada carotenóide identificado (Kelly et al., 1970; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1992; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995; Ronnekleiv et al., 1995).

A linhagem de *Hcc. morrhuae* estudada apresentou uma maior quantidade de carotenóides totais, cerca de 87,9 µg/g de massa seca, do que a apresentada pela *Hbt. salinarium*, cerca de 44,5 µg/g de massa seca (**Tabela 8**). Porém, Calo et al. (1995) verificaram uma produção de 2400 µg de carotenóide totais por grama de massa seca em uma linhagem de *Hbt. salinarium* cultivada a 37 °C por 7 dias, sendo portanto este valor bem maior que os obtidos no presente estudo para as linhagens estudadas *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarium*.

O total de carotenóides totais, biomassa e atividade antioxidante, para as bactérias *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarium*, estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Biomassa, carotenóides totais, atividade desativadora do radical ABTS^{•+} (valor de TEAC) e de O₂(¹Δ_g) (% proteção).

	Biomassa (g/L)	Carotenóides totais (µg/L) ^a	Carotenóides totais (µg/g) ^a	TEAC ^a	Proteção (%) ^a
<i>Halococcus morrhuae</i>	10,16	893,1	87,9	5,07	27
<i>Halobacterium salinarium</i>	16,4	729,8	44,5	5,28	10

^a Média das análises realizadas em triplicata

O potencial antioxidante da bacterioruberina, carotenóide majoritário, ainda não foi relatado na literatura. Portanto, os resultados obtidos da atividade desativadora do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (valor de TEAC) e de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (% proteção) foram comparados com os valores obtidos para licopeno e β -caroteno (Miller et al., 1996; Re et al., 1999).

Os valores de TEAC obtidos dos extratos de carotenóide das linhagens *Hcc. morrhuae* e *Hbt. salinarium* foram semelhantes, 5,07 e 5,28, respectivamente, pois ambas possuem composição muito similar de carotenóides.

Os valores de TEAC obtidos foram maiores que os encontrados por Re et al. (1999), de 3,08 para o licopeno e 2,57 para o β -caroteno e por Miller et al. (1996), 2,9 para licopeno e 1,9 para o β -caroteno. Portanto, a bacterioruberina possui maior capacidade de desativar o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ que o licopeno e o β -caroteno, devido ao maior número de ligações duplas conjugadas (13) em relação ao licopeno e o β -caroteno que possuem 11 ligações duplas conjugadas. Saito et al. (1997) realizaram um estudo sobre a habilidade da bacterioruberina, isolada da bactéria *Rubrobacter radiotolerans*, em seqüestrar o radical hidroxila utilizando o sistema de degradação da timina e observaram que a bacterioruberina apresentou maior habilidade (cerca de duas vezes maior) de seqüestro do radical hidroxila, comparado ao β -caroteno.

Os resultados da atividade desativadora de oxigênio singlete foram expressos por % de proteção do carotenóide ao actinômetro DMA utilizado na análise. Os resultados obtidos mostraram que a linhagem *Hcc. morrhuae* apresentou maior porcentagem de proteção (27%) do que a *Hbt. salinarium* (10%). Esta maior habilidade da *Hcc. morrhuae* em proteger o DMA contra a fotooxidação se deve ao maior teor de carotenóides totais presente na mesma quantidade de biomassa.

Tsen et al. (2006) estudaram a eficiência do licopeno em relação ao β -caroteno em neutralizar o $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ e observaram que o licopeno possui maior eficiência na desativação do oxigênio singlete que o β -caroteno.

A linhagem de *Halococcus morrhuae* apresentou maior produção de biomassa, carotenóides totais e maior atividade antioxidante, portanto foi a escolhida para realizar o planejamento fatorial completo.

4.3 Bioprodução de biomassa, carotenóides e atividade antioxidante por *Halococcus morrhuae*

Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para avaliar a quantidade de biomassa, teores de carotenóides totais e atividade antioxidante produzidos por *Halococcus morrhuae*. A matriz do planejamento composto central rotacional com os valores reais e codificados das variáveis independentes (concentração de NaCl, pH e temperatura) e os resultados das respostas (produção de biomassa, carotenóides totais e atividade antioxidante) estão apresentados na **Tabela 9**.

A produção de biomassa por litro de meio de cultivo variou de 2,046 a 7,978 g/L, sendo os maiores valores obtidos nas condições de temperatura de 30 a 40 °C e os menores valores nas temperaturas de 46 e 50 °C, confirmando que a temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam na produção de biomassa (Hayman et al., 1974). Estes resultados concordam com estudo realizado com a bactéria *Halobacterium* sp., onde foi observado crescimento elevado à temperatura de 37 °C, com redução no crescimento nas temperaturas acima ou abaixo de 37 °C (Asker & Ohta, 1999).

Tabela 9. Valores reais e codificados da matriz do delineamento composto central rotacional 2^3 e respostas obtidas para *Halococcus morrhuae*.

Ensaio	Variáveis independentes			Biomassa (g/L)	Respostas		
	X ₁	X ₂	X ₃		Carotenóides totais (µg/L)	Carotenóides totais (µg/g)	Proteção (%)
1	229,76 (-1)	6,4 (-1)	34,05 (-1)	7,718	1206,125	156,279	49,3
2	279,76 (+1)	6,4 (-1)	34,05 (-1)	7,978	1068,853	133,975	42,78
3	229,76 (-1)	7,6 (+1)	34,05 (-1)	6,482	988,895	152,566	45,35
4	279,76 (+1)	7,6 (+1)	34,05 (-1)	7,522	1106,598	147,110	36,17
5	229,76 (-1)	6,4 (-1)	45,95 (+1)	2,276	118,972	52,272	17,53
6	279,76 (+1)	6,4 (-1)	45,95 (+1)	2,740	335,330	122,372	40,49
7	229,76 (-1)	7,6 (+1)	45,95 (+1)	2,310	19,939	8,632	7,2
8	279,76 (+1)	7,6 (+1)	45,95 (+1)	2,781	228,706	82,246	31,98
9	200 (-1,68)	7,0 (0)	40 (0)	4,714	580,870	123,216	43,32
10	300 (+1,68)	7,0 (0)	40 (0)	6,060	743,350	122,67	41,35
11	250 (0)	6,0 (-1,68)	40 (0)	5,615	1418,766	252,663	63,71
12	250 (0)	8,0 (+1,68)	40 (0)	5,485	874,520	159,438	28,49
13	250 (0)	7,0 (0)	30 (-1,68)	7,726	724,348	93,752	33,8
14	250 (0)	7,0 (0)	50 (+1,68)	2,046	8,127	3,972	5,0
15	250 (0)	7,0 (0)	40 (0)	6,438	926,189	143,857	38,18
16	250 (0)	7,0 (0)	40 (0)	7,544	1185,229	157,109	44,41
17	250 (0)	7,0 (0)	40 (0)	6,126	1018,833	166,306	42,53

X₁ = concentração de NaCl (g/L), X₂ = pH; X₃ = temperatura (°C)

A **Tabela 10** apresenta o erro padrão e o nível de significância (p) dos coeficientes de regressão do modelo gerado pelo planejamento experimental para produção de biomassa.

Tabela 10. Coeficientes de regressão e erro padrão do modelo para produção de biomassa.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p
Média	6,72	0,40	16,77	<0,0001
NaCl (L)^a	0,33	0,19	1,75	0,1233
NaCl (Q)^b	-0,51	0,21	-2,47	0,0046
pH (L)	-0,13	0,19	-0,71	0,4979
pH (Q)	-0,46	0,21	-2,19	0,0641
temperatura (L)	-2,13	0,19	-11,35	<0,0001
temperatura (Q)	-0,69	0,21	-3,33	0,0126
Interação NaCl x pH	0,098	0,25	0,40	0,7008
Interação NaCl x temperatura	-0,05	0,25	-0,18	0,8579
Interação pH x temperatura	0,22	0,25	0,90	0,3986

^a L= linear; ^b Q = quadrático

A Equação 2 apresenta o modelo de segunda ordem, apenas com os parâmetros que melhor descrevem a produção de biomassa em função das variáveis independentes analisadas (concentração de NaCl, pH e temperatura), dentro da faixa estudada e com coeficientes de correlação e correlação ajustado elevados ($R^2 = 0,95$ e $R^2_{\text{ajustado}} = 0,92$).

$$\text{Biomassa} = 6,72 + 0,33.X_1 - 0,51.(X_1)^2 - 0,46.(X_2)^2 - 2,13.X_3 - 0,69.(X_3)^2 \quad (2)$$

onde: biomassa = g/L; X_1 = NaCl (g/L); X_2 = pH; X_3 = temperatura (variáveis codificadas)

Observa-se pelo modelo que a temperatura foi a variável que exerceu maior influência sobre a produção de biomassa, tendo um efeito negativo, ou seja, na faixa testada, temperaturas mais baixas favorecem a produção de biomassa. Como o termo quadrático da temperatura também foi importante e com sinal negativo, significa que a temperatura ótima está próxima do ponto central, deslocada para valores mais baixos devido ao efeito linear. Em relação à concentração de NaCl, pelo modelo as concentrações ótimas estão próximas do ponto central (efeito quadrático negativo), deslocada para valores mais altos devido ao efeito linear positivo. O pH ótimo está próximo do ponto central (pH=7), pois apenas o efeito quadrático foi significativo e negativo. Não houve interação entre as variáveis. Calculando o ponto de máxima produção de biomassa pelo modelo (igualando a zero a primeira derivada), tem-se:

$$X_1 = 0,32 \Rightarrow \text{Concentração de NaCl} = 266 \text{ g/L}$$

$$X_2 = 0 \Rightarrow \text{pH} = 7$$

$$X_3 = -1,54 \Rightarrow \text{temperatura} = 30,8^\circ\text{C}$$

$$\text{Biomassa} = 8,42 \text{ g/L}$$

A máxima produção de biomassa (7,98 g/L) foi observada no ensaio 2 onde se utilizou 279,76 g/L de NaCl, pH 6,4 e temperatura de 34°C, sendo estas condições de cultivo próximas das previstas pelo modelo, exceto para o valor de pH, pois as condições ideais estariam com o pH próximo ao ponto central.

As superfícies de resposta e curvas de contorno estão apresentadas na **Figura 16**, permitindo acompanhar o comportamento das variáveis estudadas na produção de biomassa.

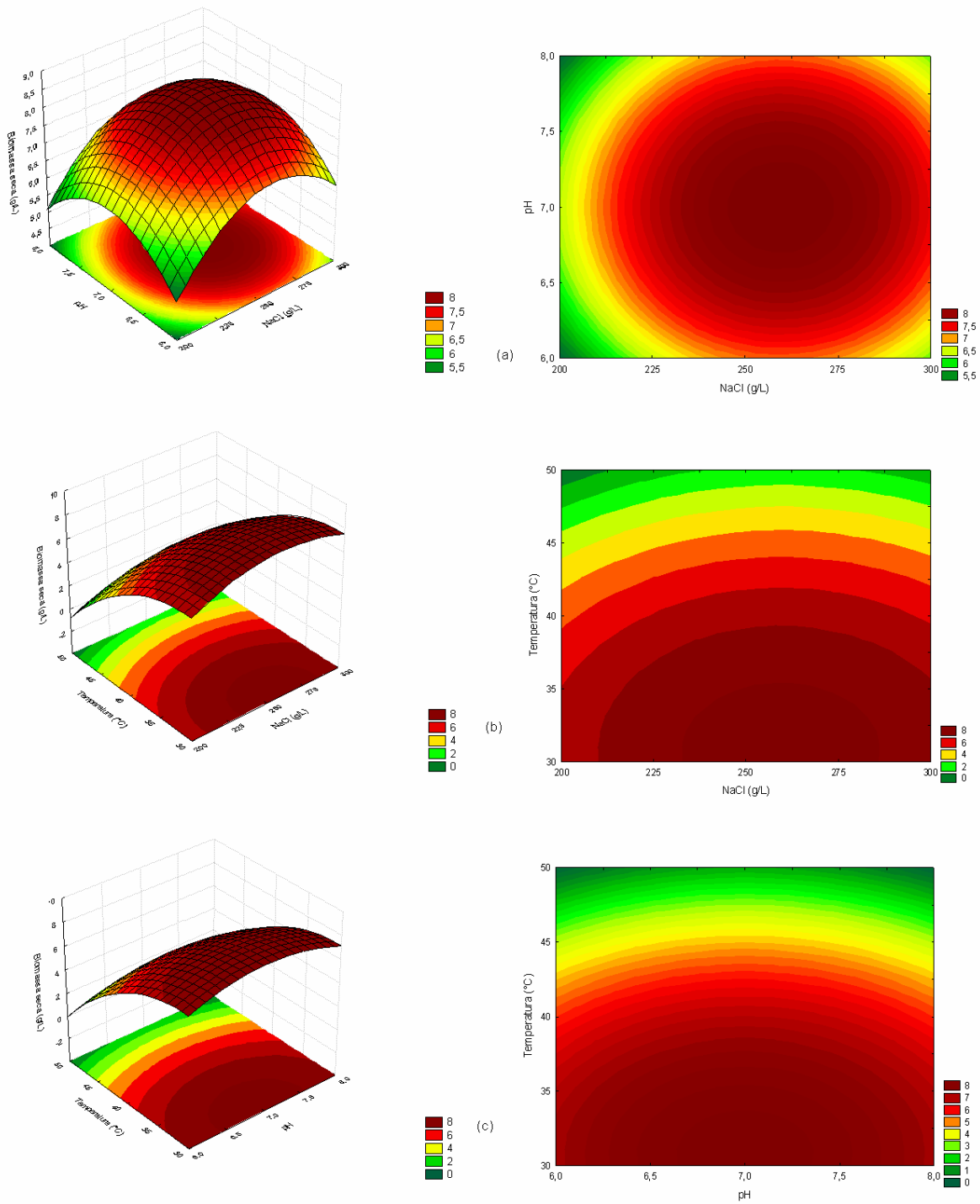


Figura 16. Superfícies de resposta e curvas de contorno para biomassa (g/L) em função da concentração de NaCl (g/L) e pH (a), concentração de NaCl (g/L) e temperatura (°C) (b) e temperatura (°C) e pH (c).

A concentração de carotenóides totais variou de 3,972 a 252,663 µg/g. A máxima concentração de carotenóides totais (252,7 µg/g) foi observada no ensaio 11 (ponto axial), onde se utilizou o valor de pH de 6,0, concentração de NaCl de 250 g/L e temperatura de 40°C. Por outro lado, a menor produção de carotenóides totais foi observada nos ensaios 7 (229,76 g/L de NaCl, pH 7,6 e temperatura de 46 °C) e 14 (250 g/L de NaCl, pH 7,0 e temperatura de 50 °C). Resultados similares foram relatados por Asker & Ohta (1999), os quais observaram que a máxima produção de carotenóides foi obtida com 250 g/L NaCl e que temperaturas acima de 40 °C proporcionaram uma redução na concentração de carotenóides totais em *Halobacterium* sp.

A **Tabela 11** apresenta o erro padrão e o nível de significância (p) dos coeficientes de regressão do modelo gerado pelo planejamento experimental para a concentração de carotenóides totais.

Tabela 11. Coeficientes de regressão e erro padrão do modelo para concentração de carotenóides totais (µg/g).

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p
Média	156,87	13,24	11,85	<0,0001
NaCl (L)^a	8,42	6,21	1,35	0,2175
NaCl (Q)^b	-15,42	6,84	-2,25	0,0584
pH (L)	-16,92	6,21	-2,72	0,0296
pH (Q)	13,96	6,84	2,04	0,0807
temperatura (L)	-34,81	6,21	-5,60	0,0008
temperatura (Q)	-41,62	6,84	-6,08	0,0005
Interação NaCl x pH	2,55	8,12	0,31	0,7632
Interação NaCl x temperatura	21,44	8,12	2,64	0,0033
Interação pH x temperatura	-11,65	8,12	-1,43	0,1947

^a L= linear; ^b Q = quadrático

A **Equação 3** apresenta o modelo de segunda ordem, apenas com os parâmetros que melhor descrevem a concentração de carotenóides totais em função das variáveis independentes analisadas (concentração de NaCl, pH e temperatura), dentro da faixa estudada e com coeficientes de correlação e correlação ajustado elevados ($R^2 = 0,94$ e $R^2_{\text{ajustado}} = 0,90$).

$$\begin{aligned} \text{Carotenóides totais} = & 156,87 - 15,42 (X_1)^2 - 16,92 X_2 + 13,96 (X_2)^2 \\ & - 34,81 X_3 - 41,62 (X_3)^2 - 21,44 X_1 \cdot X_3 \end{aligned} \quad (3)$$

onde: carotenóides totais = $\mu\text{g/g}$; X_1 = NaCl; X_2 = pH; X_3 = temperatura (variáveis codificadas)

Observa-se pelo modelo que a temperatura foi a variável que exerceu maior influência sobre a concentração de carotenóides totais, tendo um efeito negativo, ou seja, na faixa testada, temperaturas mais baixas favoreceram a síntese de carotenóides totais. Como o termo quadrático da temperatura também foi importante e com sinal negativo, significa que a temperatura ótima está próxima do ponto central, deslocada para valores mais baixos devido ao efeito linear. Em relação à concentração de NaCl, o modelo indica que as concentrações ótimas estão próximas do ponto central (efeito quadrático negativo) deslocado para valores acima do ponto central devido à interação com a temperatura. O pH ótimo está no extremo negativo ($\text{pH}=6$), pois apresentou um efeito linear negativo e um efeito quadrático positivo (ponto de mínimo), ou seja a variável deve estar a mais afastada possível do ponto central. Houve interação positiva entre as variáveis NaCl e temperatura, ou seja as concentrações estudadas de 200 a 280 g/L de NaCl associadas a baixas temperaturas (30 a 40° C) favorecem a síntese de carotenóides. Calculando o ponto de máxima concentração de carotenóides totais pelo modelo, tem-se:

$$X_1 = 0,35 \Rightarrow \text{Concentração de NaCl} = 258,8 \text{ g/L}$$

$$X_2 = -1,68 \Rightarrow \text{pH} = 6$$

$$X_3 = -0,51 \Rightarrow \text{temperatura} = 37^\circ\text{C}$$

Concentração de Carotenóides totais máxima prevista pelo modelo = 226 $\mu\text{g/g}$

A máxima concentração de carotenóides totais (252,7 µg/g) foi observada no ensaio 11, nas condições de cultivo de 250 g/L de NaCl, pH igual a 6,0 e temperatura de 40°C, sendo estas condições de cultivo próximas das condições previstas pelo modelo.

As superfícies de resposta e curvas de contorno estão apresentadas na **Figura 17**, permitindo acompanhar o comportamento das variáveis estudadas na produção de carotenóides totais.

Assim como para a variável conteúdo de carotenóides totais, a máxima porcentagem de proteção ao $O_2(^1\Delta_g)$ (63,7%) também foi observada no ensaio 11, onde se utilizou pH com valor 6,0, concentração de NaCl de 250 g/L e temperatura de 40 °C enquanto que, a menor porcentagem de proteção também foi observada nos ensaios 7 (7,2%) e 14 (5%). Novamente, as condições de alta temperatura e pH alto, utilizadas nesses dois ensaios, interferiram diretamente na porcentagem de proteção dos carotenóides. De fato, as baixas concentrações de carotenóides totais por g de biomassa apresentadas nos ensaios 7 e 14 proporcionaram baixa porcentagem de proteção, já que esta depende da quantidade de carotenóides presente no extrato analisado.

A **Tabela 12** apresenta o erro padrão e o nível de significância (p) dos coeficientes de regressão do modelo gerado pelo planejamento experimental para a porcentagem de proteção do DMA pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$.

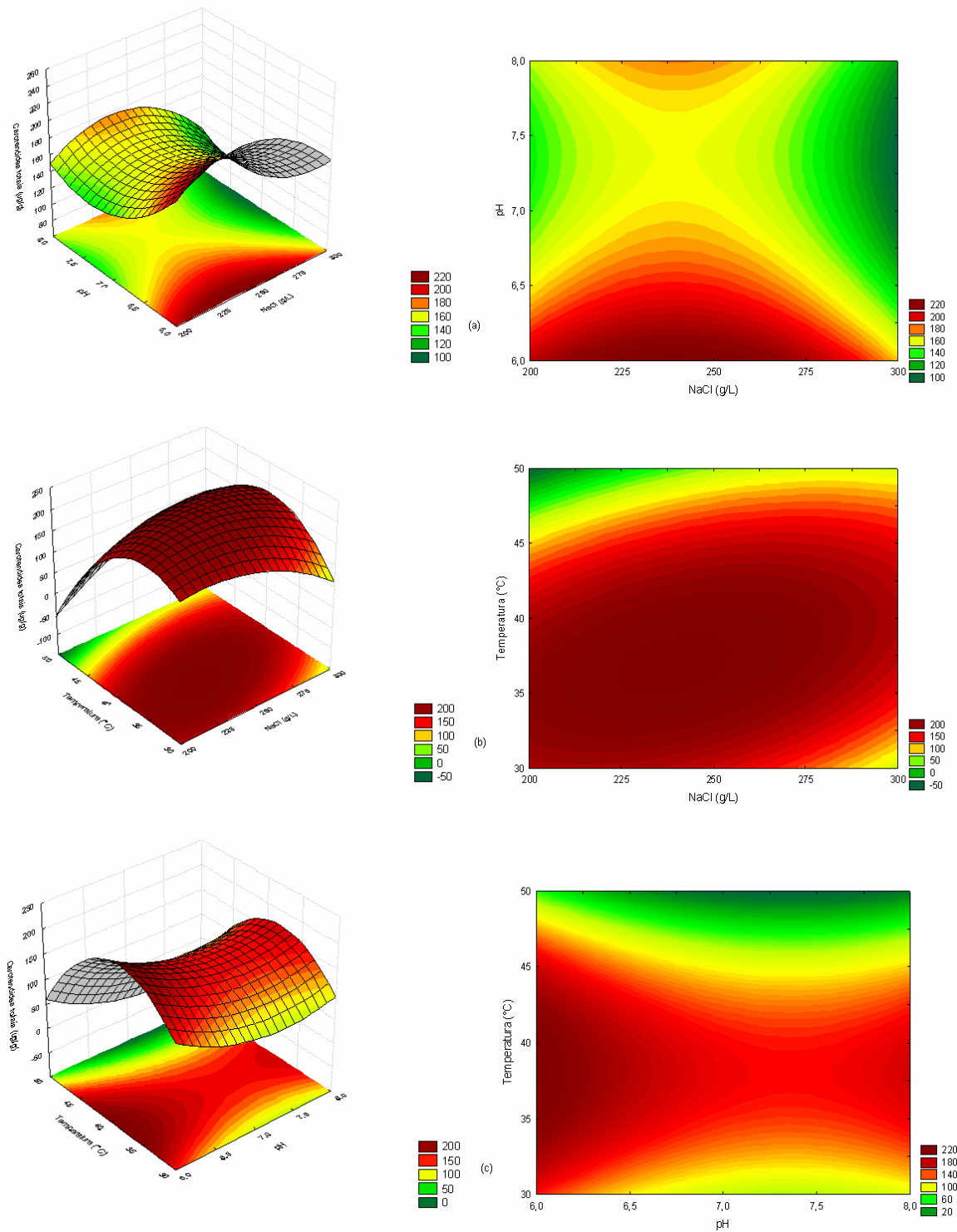


Figura 17. Superfícies de resposta e curvas de contorno para carotenóides totais (µg/g) em função da concentração de NaCl (g/L) e pH (a), concentração de NaCl (g/L) e temperatura (°C) (b) e temperatura (°C) e pH (c).

Tabela 12. Coeficientes de regressão e erro padrão do modelo para porcentagem de proteção.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p
Média	41,82	3,50	11,94	<0,0001
NaCl (L)^a	2,10	1,65	1,28	0,2418
NaCl (Q)^b	-0,17	1,81	-0,09	0,9298
pH (L)	-6,49	1,65	-3,94	0,0056
pH (Q)	1,17	1,81	0,64	0,5402
temperatura (L)	-9,14	1,65	-5,56	0,0009
temperatura (Q)	-8,27	1,81	-4,57	0,0026
Interação NaCl x pH	-0,11	2,15	-0,05	0,9624
Interação NaCl x temperatura	7,93	2,15	3,69	0,0078
Interação pH x temperatura	-1,04	2,15	-0,48	0,6449

^a L= linear; ^b Q = quadrático

A **Equação 4** apresenta o modelo de segunda ordem, com os parâmetros que melhor descrevem a porcentagem de proteção contra o $O_2(^1\Delta_g)$ em função das variáveis independentes analisadas (concentração de NaCl, pH e temperatura), dentro da faixa estudada e com coeficientes de correlação e correlação ajustado elevados ($R^2 = 0,93$ e $R^2_{ajustado} = 0,92$).

$$\% \text{ Proteção} = 41,82 - 6,49 X_2 - 9,14 X_3 - 8,27 (X_3)^2 + 7,93 X_1 \cdot X_3 \quad (4)$$

onde % proteção = g/L; X_1 = NaCl, X_2 = pH; X_3 = temperatura (variáveis codificadas).

Observa-se pelo modelo que a temperatura foi a variável que exerceu maior influência sobre a porcentagem de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$, tendo um efeito linear negativo e como o termo quadrático da temperatura também foi importante e com sinal negativo, significa que a temperatura ótima está próxima do ponto central, deslocada para valores

mais baixos. O pH foi outra variável que também influenciou na porcentagem de proteção, com efeito linear negativo, ou seja, na faixa testada, pH mais baixos favoreceram maiores porcentagens de proteção. Houve também uma interação positiva entre as variáveis NaCl e temperatura, ou seja, as concentrações de 200 a 280 g/L de NaCl associadas a baixas temperaturas (30 a 40 °C) favoreceram a proteção. Calculando o ponto de máxima porcentagem de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$, pelo modelo, tem-se:

$$X_1 = -1,68 \Rightarrow \text{NaCl} = 200 \text{ g/L}$$

$$X_2 = -1,68 \Rightarrow \text{pH} = 6,0$$

$$X_3 = -1,36 \Rightarrow \text{temperatura} = 31,9^\circ\text{C}$$

$$\% \text{ proteção} = 67,2 \%$$

A máxima porcentagem de proteção ao $O_2(^1\Delta_g)$ (63,7%) também foi observada no ensaio 11, na concentração de 250 g/L de NaCl, pH 6,0 e 40 °C. Apenas o valor de pH utilizado foi igual ao previsto pelo modelo para obter máxima porcentagem de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$, portanto a porcentagem de proteção ao $O_2(^1\Delta_g)$ obtida no ensaio 11 foi menor que a prevista pelo modelo devido as condições de cultivo utilizadas.

As superfícies de resposta e curvas de contorno estão apresentadas na **Figura 18**, permitindo acompanhar o comportamento das variáveis estudadas na porcentagem de proteção contra o $O_2(^1\Delta_g)$.

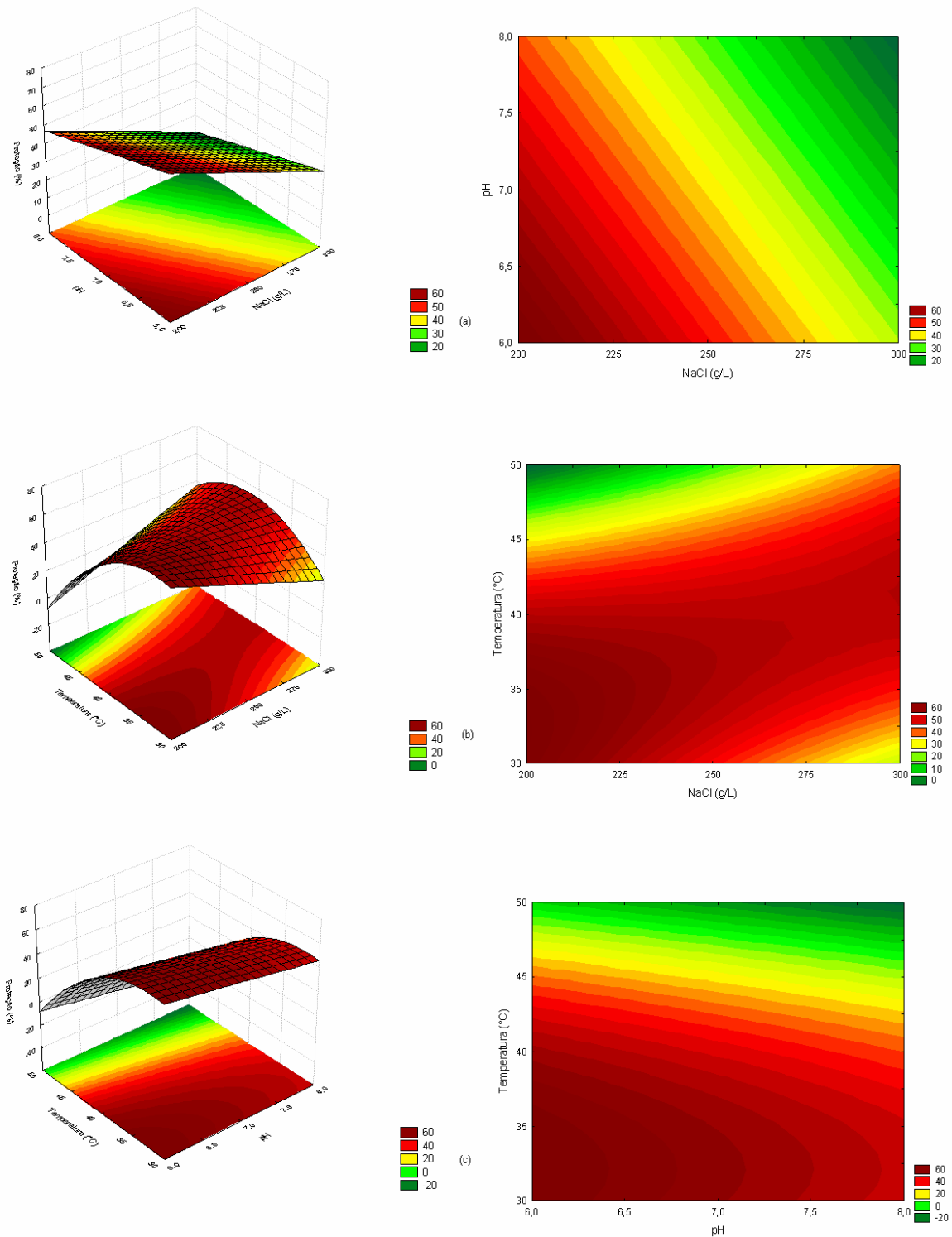


Figura 18. Superfícies de resposta e curvas de contorno para porcentagem de proteção em função da concentração de NaCl (g/L) e pH (a), concentração de NaCl (g/L) e temperatura (°C) (b) e temperatura (°C) e pH (c).

Em resumo, neste estudo pode-se observar que a temperatura foi a variável que mais afetou a produção de biomassa, carotenóides totais e % de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. Os resultados obtidos mostraram que valores próximos ao ponto central e valores mais baixos de temperatura (aproximadamente 30 °C) favoreceram a produção de biomassa, carotenóides totais e % de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados na bactéria *Halobacterium* sp., onde a máxima produção de carotenóides foi obtida à temperatura de 37 °C (Asker & Ohta, 1999). A temperatura é um dos fatores mais importantes na produção de carotenóides, pois segundo Bhosale (2004) a temperatura atua no controle da concentração das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenóides.

A variável NaCl foi significativa apenas para as respostas produção de biomassa e de carotenóides totais, sendo que concentrações de NaCl próximas do ponto central (250 g/L) e concentrações mais altas (aproximadamente 300 g/L) proporcionaram alta produção de biomassa e de carotenóides totais. Estes resultados corroboraram com os dados obtidos por Asker e Ohta (1999), os quais observaram que a máxima produção de carotenóides foi obtida na concentração de 250 g/L de NaCl.

A variável pH foi significativa para as respostas produção de biomassa, carotenóides totais e % de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. Valores de pH próximos do ponto central favoreceram a produção de biomassa e baixos valores de pH proporcionaram altas concentrações de carotenóides totais e elevada % de proteção dos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. Os resultados obtidos para essa variável diferem dos dados encontrados por Asker e Ohta (1999), nos quais a máxima produção de carotenóides foi obtida em pH 7,2.

Houve interação significativa apenas entre as variáveis NaCl e temperatura para as respostas produção de carotenóides e % de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. As concentrações de 200 a 280 g/L de NaCl associadas a baixas temperaturas (30 a 40 °C) favoreceram a produção de carotenóides e a % de proteção dos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$.

Além disso, a partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 , pode-se estimar as condições ótimas de cultivo para obter a máxima produção de biomassa, carotenóides totais e de porcentagem de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. As faixas de 200 a 280 g/L NaCl, temperatura de 30 a 40 °C e pH de 6,0 a 6,4 proporcionaram uma máxima produção de biomassa, carotenóides totais e de porcentagem de proteção.

5. CONCLUSÕES

A bactéria *Halococcus morrhuae* apresentou maior produção de biomassa celular, de carotenóides totais e maior habilidade na desativação do oxigênio singlete que a bactéria *Halobacterium salinarium*. Os valores de TEAC foram semelhantes tanto para a bactéria *Hcc. morrhuae* quanto para a *Hbt. salinarium*, pois ambas possuem composição de carotenóides muito similar.

A aplicação de HPLC-PDA-MS/MS permitiu identificar oito carotenóides nas duas linhagens. O carotenóide majoritário foi all-*trans*-bacterioruberina, com 50 carbonos e 13 ligações duplas conjugadas, perfazendo 51% na linhagem *Hcc. morrhuae* e 57% na *Hbt. salinarium*. Foram também identificados carotenóides minoritários derivados de all-*trans*-bacterioruberina em *Hcc. morrhuae* e *Hbt. salinarium*, respectivamente: 13-*cis*-bacterioruberina (7,8 e 10,5%), 5-*cis*-bacterioruberina (12 e 10,5%) e 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina (3% em ambas), all-*trans*-bisanidrobacterioruberina (1,2 e 0,56%), *cis*-bisanidrobacterioruberina (1,2 e 1,9%), *cis*-bisanidrobacterioruberina (1,3 e 0,12%) e *cis*-trisanidrobacterioruberina (2,4 a 3,5%). O carotenóide all-*trans*-trisanidrobacterioruberina (2,3%) foi encontrado apenas em *Hcc. morrhuae*.

Através do delineamento composto central rotacional (2^3) composto pelas variáveis independentes: concentração de NaCl, pH e temperatura, empregado na linhagem *Hcc. morrhuae*, observou-se que, nas faixas testadas, a temperatura foi a variável que mais influenciou na produção de biomassa, de carotenóides totais e na porcentagem de proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. Nas faixas testadas, temperaturas próximas ao ponto central e mais baixas favoreceram a produção de biomassa e de

carotenóides, as concentrações de NaCl testadas associadas a baixas temperaturas também favoreceram a síntese de carotenóides e valores baixos de pH e de temperatura favoreceram a proteção proporcionada pelos carotenóides contra o $O_2(^1\Delta_g)$. Além disso, os carotenóides da linhagem *Hcc. morrhuae* apresentaram alta porcentagem de proteção contra o $O_2(^1\Delta_g)$. Esta habilidade se deve ao fato desses carotenóides apresentarem uma cadeia longa de 50 carbonos e 13 ligações duplas conjugadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, Z.; EREN, A.T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochem. Eng. J.*, 35, 107-113, 2007.
- ALCÂNTARA, S.; SANCHEZ, S. Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 697-700, 1999.
- ASKER, D.; OHTA, Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 88, 617-621, 1999.
- ASKER, D.; AWAD, T.; OHTA, Y. Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TMT^T: an extremely halophilic canthaxanthin-producing Archaeon. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 37-43, 2002.
- ASGARANI, E. et al. Mechanisms of DNA protection in *Halobacterium salinarum*, an extremely halophilic bacterium. *Microbiol. Res.*, 154, 185-190, 1999.
- AUSICH, R.L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure Appl. Chem.*, 69, 2169-2173, 1997.
- BACK, S.; ENZELL, C.R. Mass Spectrometry. In: *Carotenoids: Spectroscopy*, vol 1B. BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. (Eds.). Birkhauser, Basel, p.261-320, 1995.
- BEN-AMOTZ, A. *Dunaliella* β -caroteno from science to commerce. In: *Enigmatic Microorganisms and life in extreme environments*. Seckbach J. (Ed), 401-410, 1999.
- BERGEY'S, D. H.; KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, 1, p. 262-265.

- BOHM, V.; PUSPITASARI-NIENABER, N.L. FERRUZZI, M.G.; SCHWARTZ, S.J. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -Carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 221-226, 2002.
- BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). Microalgal biotechnology. Cambridge: Cambridge University, 1988, p. 477.
- BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. β -Carotene Production with Algae. In VANDAMME, J. E. (Ed). Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors, *Elsevier Appl. Sc.*: New York, p. 15-26, 1989.
- BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, L. J.; KESSLY, D. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.*, 2, 111-119, 1990.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 351-361, 2004.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. *Statistics for experimenters*. John Wiley & Sons: New York, 1978, p. 653.
- BRITTON, G. UV/Vis Spectroscopy. In: *Carotenoids: Spectroscopy*, vol 1B. BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.). Birkhauser, Basel, 1995, p. 13-62.
- BRITTON, G. Overview of Carotenoid Biosynthesis. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. (Eds.) Carotenoids serie, vol.3: *Biosynthesis*. Birkhäuser, Basel, 1998, p. 13-147.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. *Carotenoids Handbook*; Birkhauser: Basel, Switzerland, 2004.
- BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: Britton, G; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.L. (eds) Carotenoids , vol 1b, Birkhauser, Basel, 1995, p. 13-62.
- BROWN, A.D. Microbiol water stress. *Bacteriol. Rev.* 40, 8063-846, 1976.
- CALO, P. et al. Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy echinenone and *trans*-astaxanthin. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 282-285, 1995.

- CARDARELLI, C.R.; BENASSI, M.T.; MERCADANTE, A.Z. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT-Food Science Technol.*, 41, 1689-1693, 2008.
- CARIS-VEYRAT, C. *Antioxidant and prooxidant actions and stabilities of carotenoids in vitro and in vivo and carotenoid oxidation products*. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu (Ed.). CRC, New York, p.177-192, 2007.
- CHATOPADHYAY, M.K.; JAGANNADHAM, M.V.; SHIVAJI, S. Carotenoids pigments of a Antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus roseus*: temperature, dependent biosynthesis, structure, and interaction with synthetic membranes. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 239, 85-90, 1997.
- De ROSSO, V.V. *Composição de carotenóides e antocianinas em acerola – Estabilidade e atividade antioxidante em sistema-modelo de extratos de antociânicos de acerola e de açaí; por Adriana Zerlotti Mercadante, Campinas*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.
- DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5062-5072, 2007 a.
- DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9135-9141, 2007 b.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 532-538, 1989.
- D´SOUZA, S.E.; ALTEKAR, W.; D´SOUZA, S.F. Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (<20%) in the growth medium. *Arch. Microbiol.*, 168, 68-71, 1997.
- DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Tech.*, 16, 389-406, 2005.

- DUFOSSE, L. Microbial production of food grade pigments. *Food Technol. Biotechnol.*, 44, 313-321, 2006.
- El-Sayed W. S. M. et al. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarium*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. *Plant Cell Physiol.*, 43, 379-383, 2002.
- FEOFILOVA, E.P. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 30, 143-153, 1994.
- FONTANA, J.D. et al. Asthaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: Optimization of low-cost culture media and yeast cell lysis. *App. Biochem. Biotechnol.*, 63-65, 305-314, 1997.
- FRONG, N.J.C. et al. Carotenoids accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 750-756, 2001.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. Production of *Dunaliella salina* biomasa rich in 9-*cis*- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.*, 115, 81-90, 2005.
- GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Ver. Nutr.*, 20, 537-548, 2007.
- GOODWIN, J.R.; HAFNER, L.M.; FREDERICKS, P.M. Raman spectroscopic study of the heterogeneity of microcolonies of a pigmented bacterium. *J. Raman Spectrosc.*, 37, 932-936, 2006.
- GRANT, W.D.; LARSEN, H. Extremely halophilic archaeobacteria order Halobacteriales ord. nov. In: STALEY, J.T. (Ed) et al. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, v. 3, 1989, p. 2216-2228.
- GU, Z.; CHENA, D.; HANA, Y.; CHENA, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT* 41:1082–1088, 2008.
- HALLIWELL, B. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, 33, 601-617, 1995.
- HARA, M. et al. Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: zeaxanthin, zeaxanthin glucoside and thermozeaxanthin. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.*, 28, 274–279, 2008.

- HU, Z.C.; et al. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enz. Microbial Technol.*, 39, 586-590, 2006.
- JOHNSON, E.A.; VILLA, T.G.; LEWIS, M.J.; PHAFF, H.J. Simple method for the isolation of astaxanthin from the Basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Env. Microbiol.*, 54, 1155-1158, 1978.
- JOHNSON, A.E.; AN, G.H. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11, 297-326, 1991.
- JOHNSON, A.E.; SCHROEDER, W.A. Microbial carotenoid. *Adv. Biolchem. Eng. Biotechnol.*, 53, 119-178, 1995.
- Kelly, M.; NORGARD, S.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids XXXI.* C₅₀-Carotenoids 5.** Carotenoids of *Halobacterium salinarum*, especially bacterioruberin. *Acta Chem. Scand.*, 24, 2169-2182, 1970.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 66, 5, 1003-1010, 1994.
- KRINSKY, N.I. Carotenoids antioxidants. *Nutrition*, 17, 815-817, 2001.
- KUSHWAHA, S.C.; GOCHNAUER, M.B.; KUSHNER, D.J.; KATES, M. Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 20, 241-245, 1974.
- LARSEN, H. Genus Halococcus Schoop 1935, 817^{AL}. In: STALEY, J.T. (Ed) et al. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, 1, 1984, p. 2228-2230.
- LARSEN, H.; GRANT, W.D. Genus Halobacterium Elazari-Volcani, 207^{AL}. In: STALEY, J.T. (Ed) et al. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, 3, 1989, p. 2219-2228.
- LÓPEZ-NIETO, M.J.; et al. Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 153-159, 2004.
- LORENZ, R.T.; CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18, 160-167, 2000.

- LIU, Y.S.; WU, J.Y.; HO, K.P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem. Eng. J.*, 27, 331-335, 2006.
- LUTINAES, B.F.; STRAND, A.; PETURSDÓTTIR, S.K.; LIAAEN-JENSEN, S. Carotenoids of thermophilic bacteria- *Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochem. Syst. Ecol.*, 32, 455-468, 2004.
- MANIKANDAN, M.; PASIC, L.; KANNAN, V. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archae (family *Halobacteriaceae*) by response surface methodology. *Bioresource Technol.*, 100, 3107-3112, 2009.
- MANTZOURIDOU, F.; TSIMIDOU, M.Z. Lycopene formation in *Blakeslea trispora*. Chemical aspects of a bioprocess. *Trends Food Sci. Tech.*, 19, 363-371, 2008.
- MILLER, N.J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84, 407-412, 1993.
- MILLER, N.J. et al. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.*, 384, 240-242, 1996.
- MOORE, R.L.; MCCARTHY, B.J. Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, 99, 248-254, 1969.
- MONTENEGRO, M. A. et al. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 367-373, 2004.
- OREN, A. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 334-3348, 1999.
- OREN, A.; LITCHFIELD, C.D. A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 173, 353-358, 1999.
- OREN, A. Diversity to halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 56-63, 2002.
- OROSA, M.O.; FRANQUEIRA, D.O.; ABALDE, C.J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Biores. Technol.*, 96, 373-378, 2005.

- ORSET, S.C.; YOUNG, A.J. Low-temperature-induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 35, 520-527, 1999.
- PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V; VAZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. *Process Biochem.*, 33, 181-187, 1998.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53, 4290-4302, 2005.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 1231-1237, 1999.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant sci.*, 2, 152-159, 1997.
- RIOS, A. DE O.; MERCADANTE, A. Z.; BORSARELLI, C. D. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dyes Pigments*, 74, 561-565, 2007.
- RODRIGUEZ-VALERA, F.; VENTOSA, A.; QUESADA, E.; RUIZ-BERRAQUERO, F. Some physiological features of a *Halococcus* sp. At low salt concentrations. *FEMS Microbiol. Lett.*, 15, 249-252, 1982.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92, 235-254, 2005.
- RONNEKLEIV, M.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids. 52.* C₅₀-carotenoids 22. naturally occurring geometrical isomers of bacterioruberin. *Acta Chem. Scand.*, 46, 1092-1095, 1992.
- RONNEKLEIV, M.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids 53*, C₅₀-carotenoids 23; carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria. *Biochem. System. Ecol.*, 23, 627-734, 1995.
- RONNEKLEIV, M.; LENES, M., NORGARD, S., LIAAEN-JENSEN, S. Three dodecaene C₅₀-carotenoids from halophilic bacteria*. *Phytochemistry*, 39, 631-634, 1995.
- ROTHSCHILD, L.J.; MANCINELLI, R.L. Life in extreme environments. *Nature*, 409, 1092-1101, 2001.

RUBINSTEINS ET AL. 1998

SAITO, T.; MIYABE, Y.; IDE, Y.; YAMAMOTO, O. Hydroxyl radical scavenging ability of bacterioruberin. *Radiat. Phys. Chem.*, 50, 267-269, 1997.

SCHROEDER, W.A.; JOHNSON, E.A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.*, 270, 18374-18379, 1995.

SEDMAK, J.J.; WEERASINGHE, D.K.; JOLLY, S.O. Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tec.*, 4, 107-112, 1990.

SEKI, S.I.; SASABE, H.; TOMIOKA, H. Voltage-dependent absorbance change of carotenoids in halophilic archaeobacteria. *Bioch. Biophys. Acta*, 1284, 79-85, 1996.

SHAHMOHAMMADI, H.R. et al. Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarum* against DNA-damaging agents. *J. Radiat. Res.*, 39, 251-262, 1998.

SHER, J.; ELEVI, R.; MANA, L.; OREN, A. Glycerol metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter rubber*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 232, 211-215, 2004.

SHERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. *Inst. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 225-420, 1980.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 87-96, 2006.

SQUINA, F.M. *Estudos dos carotenóides de leveduras do gênero Rhodotorula: Desenvolvimento de método analítico, influência de inibidores e cultivo em meio alternativo a base de caldo de cana-de-açúcar*. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2001.

SQUINA, F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, 39, 309-318, 2003.

SQUINA, F.M.; YAMASHITA, F.; PEREIRA, J.L.; MERCADANTE, A.Z. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnol.*, 16, 227-235, 2002.

- STATSOFT. Statistica (data analysis software system), version 9.0, 2009.
- SUMPER, M.; REITMEIER, H.; OESTERHELT, D. Biosynthesis of the purple membrane of Halobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 15, 187-194, 1976.
- TORREBLANCA, M. et al. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* genus nov. and *Haloferax* genus nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 8, 89-99, 1986.
- TSEN, K-T; TSEN, S-W; KIANG, J.G. Lycopene is more potent than beta carotene in the neutralization of singlet oxygen: role of energy transfer probed by ultrafast Raman spectroscopy. *J. Biomedical Optics*, 11, 064025-1-064025-6, 2006.
- VANDAMME E. J. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 53, 313-327, 1992.
- VILLEN, R.A. Aspectos econômicos. In: *Biotecnologia Industrial*. Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Eds). São Paulo, 2001, p. 523-541.
- WANG, Q.; LI, W. et al. *Halococcus gingdaonensis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a crude sea-salt sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 600-604, 2007.
- YOKOYAMA, A.; IZUMIDA, H.; MIKI, W. Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1842-1844, 1994.
- YOKOYAMA, A.; SHIZURI, Y.; HOSHINO, T.; SANDMANN, G. Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Archives of Microbiology* 165: 342-345, 1996.
- YAMANE, Y. et al. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4471-4478, 1997.
- YANCEY, P. H. et al. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214–1216, 1982.