

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROSSANA CALEGARI DOS SANTOS

**OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES UTILIZANDO A BACTÉRIA *Halorubrum
saccharovorum* (ARCHAEA)**

**CURITIBA
2012**

ROSSANA CALEGARI DOS SANTOS

**OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES UTILIZANDO A BACTÉRIA *Halorubrum
saccharovorum* (ARCHAEA)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim

Coorientadoras: Prof.^a Dr.^a Francinete Ramos
Campos
Prof.^a Dr.^a Debora Brand

**CURITIBA
2012**

TERMO DE APROVAÇÃO

ROSSANA CALEGARI DOS SANTOS

Título: OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES UTILIZANDO A BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum* (ARCHAEA)

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof. Dr. Tania Maria Bordin Bonfim
Orientadora


Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof. Dr. Geraldo Picheth
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 20 de dezembro de 2012.

Aos meus pais, Eunice e Reginaldo.
Ao meu marido, Ricardo,
pelo incentivo na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me concede.

À minha família, especialmente minha mãe Eunice Calegari dos Santos e meu pai Reginaldo Chaves dos Santos, pelo amor, pelo carinho, pela enorme dedicação, pela educação que me proporcionaram, pela paciência nos momentos difíceis e pelo constante incentivo e apoio.

Ao meu querido marido Ricardo Alexandre Diogo, pelo amor, pela paciência, pela companhia nos finais de semana e nas noites na universidade, pelo conserto dos equipamentos do laboratório, pela enorme colaboração na elaboração deste trabalho, pelo contato com os professores da Pontifícia Universidade Católica do Paraná que me auxiliaram neste trabalho e pelas correções da dissertação.

Ao meu irmão Reginaldo Chaves dos Santos Segundo, pela sempre presença, por entender e fazer meus sobrinhos queridos entenderem a minha ausência em alguns momentos.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim, por todo o conhecimento que me proporcionou, pela amizade e carinho, pelos conselhos preciosos, pelo incentivo, por ter permitido a finalização deste trabalho antecipadamente e por ter sido a principal responsável pelo meu ingresso no doutorado.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Francinete Ramos Campos, pelo auxílio nas extrações dos carotenoides e nas análises cromatográficas e espectrométricas, pela dedicação e pelo estímulo constante.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Debora Brand, pela revisão do *Abstract* e por todo o apoio.

À Prof.^a Dr.^a Sandra Mara Woranovicz Barreira, pela confiança e por ter permitido o uso do liofilizador por várias semanas seguidas, inclusive nos finais de semana e feriados.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, por ter permitido o uso dos equipamentos do Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB).

Ao Prof. Dr. Andersson Barison do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio com as análises de RMN.

Ao Prof. Ms. Edgard Pedroso da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por ter me recebido com muito carinho em sua casa em um sábado à tarde e na universidade, por ter me ensinado a utilizar o *software* Minitab, pela preciosa colaboração na realização dos testes no Minitab e na interpretação dos resultados do planejamento fatorial, pelas dúvidas sanadas por telefone e e-mail e pela infinita paciência.

Ao Prof. Dr. Ângelo Márcio Oliveira Sant'Anna da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo auxílio na interpretação dos resultados do planejamento fatorial.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin e ao Prof. Dr. Geraldo Picheth, por terem aceitado o convite para participação em minha banca de defesa de mestrado, pela correção da dissertação, pelas sugestões para este trabalho e para a sua continuidade e por terem permitido que eu aprendesse ainda mais durante a correção deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, pela ajuda, pelas brincadeiras e palavras de conforto nos momentos difíceis.

Aos colegas do Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB), pelo auxílio na utilização dos equipamentos e pela paciência em abrir a porta do laboratório toda vez que eu apertava a campainha.

A todos os amigos, pela presença, pelo carinho, pelas conversas e pela demonstração de interesse em saber um pouco mais sobre o meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

Com paciência e perseverança muito se alcança.

Théophile Gautier

RESUMO

Os carotenoides são pigmentos que apresentam funções relacionadas à saúde, atuando na prevenção de doenças e também são aplicados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, atuando como corantes e antioxidantes. Diversos organismos são capazes de produzir carotenoides, entre eles estão os halofílicos do domínio *Archaea*. Dessa forma, a bactéria halofílica *Halorubrum saccharovororum*, pertencente ao domínio *Archaea*, foi cultivada para a investigação da sua composição de carotenoides por espectrofotometria, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Essas análises foram realizadas no extrato seco obtido a partir da extração com acetona dos pigmentos das células secas do micro-organismo. Os resultados obtidos nas análises de CLAE-EM e RMN de ^1H evidenciaram a presença no extrato do carotenoide bacterioruberina, que possui 50 átomos de carbono e apresenta alta atividade antioxidante, além de outros compostos isoprenoides. Portanto, a existência da bacterioruberina no extrato foi confirmada pela presença dos íons de m/z 741, 723, 705 e 687 $[\text{M}+\text{H}]^+$ nos espectros de massas extraídos do cromatograma obtido, bem como dos sinais de deslocamento químico na região de 5,4 a 6,8 ppm e das constantes de acoplamento características do esqueleto isoprenoide da bacterioruberina no espectro de RMN de ^1H . Com isso, um protocolo para obtenção e identificação de carotenoides produzidos pela bactéria *Halorubrum saccharovororum* foi desenvolvido. Uma vez que foi confirmada a produção de pigmentos carotenoides, como a bacterioruberina, pela bactéria *Halorubrum saccharovororum*, um planejamento fatorial 2^4 completo foi realizado. Nesse planejamento foram avaliados os efeitos dos fatores pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de cultivo na produção de biomassa e de carotenoides totais. Os resultados do planejamento fatorial foram analisados por meio do *software* Minitab 7.0 e evidenciaram a existência de interações estatisticamente significativas de segunda e de terceira ordem. Os principais fatores que afetaram positivamente a formação de células e a produção de carotenoides pela bactéria *Halorubrum saccharovororum* foram o pH de 7,5 e a temperatura de 37°C , fornecendo concentração de células entre 2,2 e $2,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e concentração de carotenoides entre 72 e $90 \mu\text{g}$ de carotenoides por grama de células secas.

Palavras-chave: *Archaea*. Halofílico. Carotenoides. *Halorubrum saccharovororum*. Planejamento fatorial.

ABSTRACT

Carotenoids are pigments that present functions related to health, acting in disease prevention, and have applications in food, pharmaceutical and cosmetic industry, acting as colorants or antioxidants. Different microorganisms are capable of producing carotenoids, including the halophilic microorganisms of the *Archaea* domain. Therefore, the halophilic bacterium *Halorubrum saccharovorum* belonging to the *Archaea* domain was cultivated for the investigation of its carotenoid composition by spectrophotometry, thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H RMN). These analyses were performed in the acetone dry extract of the pigments of *Halorubrum saccharovorum* dry cells. The results from the HPLC-MS and ^1H NMR analyses evidenced the presence in the extract of the carotenoid bacterioruberin, that possesses 50 carbon atoms and presents high antioxidant capacity, beyond other isoprenoid compounds. Therefore, bacterioruberin existence in the extract was confirmed by the presence of the ions presenting m/z 741, 723, 705 e 687 $[\text{M}+\text{H}]^+$ in the mass spectra extracted from the obtained chromatogram in addition to the chemical shifts in the region of 5.4 to 6.8 ppm and the coupling constants characteristics of the bacterioruberin isoprenoid skeleton in the ^1H NMR spectrum. In this way, a protocol for the achievement and identification of carotenoids produced by the bacterium *Halorubrum saccharovorum* was developed. Once it was confirmed the production of carotenoid pigments, as bacterioruberin, by the bacterium *Halorubrum saccharovorum*, a 2^4 full factorial design was accomplished. In this design, it were evaluated the effects of pH, temperature, stirring speed and culture time in biomass and total carotenoid formation. The factorial design results were analyzed using Minitab 7.0 statistical software and showed the existence of second and third order interactions statistically significant. The main factors that affected positively the formation of cells and the production of carotenoids by the bacterium *Halorubrum saccharovorum* were pH of 7.5 and temperature of 37°C , providing the cell concentration between 2.2 and $2.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of dry cell and the total carotenoid concentration between 72 and $90\text{ }\mu\text{g}$ of total carotenoids per gram of dry cells.

Keywords: *Archaea*. Halophilic. Carotenoids. *Halorubrum saccharovorum*. Factorial design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - ESTRUTURAS DE DOIS CAROTENOS, O β -CAROTENO (a) E O LICOPENO (f), E DE CINCO XANTOFILAS, A VIOLAXANTINA (b), A CANTAXANTINA (c), A ZEAXANTINA (d), A TORULARODINA (e) E A ESPIRILOXANTINA (g).22
- FIGURA 2 - BACTERIORUBERINA E SEUS DERIVADOS: (a) *trans*-BACTERIORUBERINA, (b) BISANIDROBACTERIORUBERINA, (c) TRISANIDROBACTERIORUBERINA, (d) *5-cis*-BACTERIORUBERINA, (e) *13-cis*-BACTERIORUBERINA, (f) *9-cis*-BACTERIORUBERINA.....25
- FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DE CAROTENOIDES E OUTROS LIPÍDIOS NAS BACTÉRIAS HALOFÍLICAS27
- FIGURA 4 - BIOSÍNTESE DA BACTERIORUBERINA NAS BACTÉRIAS HALOFÍLICAS A PARTIR DO LICOPENO27
- FIGURA 5 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO EM ACETONA MOSTRANDO AS BANDAS 1, 2 E 3 VISUALIZADAS NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 254 nm (A) E AS BANDAS 4 E 5 VISUALIZADAS NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 365 nm (B)50
- FIGURA 6 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO EM METANOL MOSTRANDO AS BANDAS 1, 2 E 3 VISUALIZADAS NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 254 nm51
- FIGURA 7 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO EXTRATO EM ACETONA DAS CÉLULAS SECAS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum*52
- FIGURA 8 - CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE POR CLAE-APCI-EM DO EXTRATO EM ACETONA DAS CÉLULAS SECAS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum*, UTILIZANDO O GRADIENTE VII55
- FIGURA 9 - CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE POR CLAE-APCI-EM DO EXTRATO EM ACETONA DAS CÉLULAS SECAS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum*, UTILIZANDO O GRADIENTE XI.56
- FIGURA 10 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 16,3 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....57
- FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 17,6 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....58

FIGURA 12 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 18,8 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	58
FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 19,9 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	59
FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 22,3 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	60
FIGURA 15 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 28,8 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	61
FIGURA 16 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 29,2 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	61
FIGURA 17 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 27,5 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	62
FIGURA 18 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 31,9 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	63
FIGURA 19 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 33,4 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO.....	64
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H OBTIDO A PARTIR DA AMOSTRA SOLUBILIZADA EM CDCl ₃ E PROVENIENTE DO EXTRATO SECO DAS CÉLULAS DA BACTÉRIA <i>Halorubrum saccharovorum</i>	65
FIGURA 21 - ESTRUTURA DA BACTERIORUBERINA EVIDENCIANDO OS VALORES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS NA REGIÃO DE 5,4 A 6,8 ppm	65
FIGURA 22 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS DOS ENSAIOS 1 A 16.	69
FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE CAROTENOIDES TOTAIS DOS ENSAIOS 1 A 16 (a) E DOS ENSAIOS 13 A 16 (b).....	70
FIGURA 24 - EFEITOS PRINCIPAIS DO pH (a), DA TEMPERATURA (b) E DO TEMPO DE CULTIVO (c) NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.....	72
FIGURA 25 - EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM DO pH E DA TEMPERATURA (a), DO pH E DO TEMPO DE CULTIVO (b), DO pH e DA VELOCIDADE	

DE AGITAÇÃO (c) E DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE CULTIVO (d) NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS	74
FIGURA 26 - EFEITOS PRINCIPAIS DO pH (a), DA TEMPERATURA (b) E DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (c) NA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS	76
FIGURA 27 - EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM DO pH E DA TEMPERATURA (a), DA TEMPERATURA E DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (b), DO pH E DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (c), DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE CULTIVO (d) NA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS	77
FIGURA 28 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E CAROTENOIDES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA BACTÉRIA <i>Halorubrum saccharovorum</i>	79

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS HALOFÍLICAS DO DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i>	26
QUADRO 2 - PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴ PARA VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE QUATRO FATORES NA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E CAROTENOIDES	38
QUADRO 3 - COMBINAÇÕES DE SOLVENTES E GRADIENTES UTILIZADOS PARA A CONSTITUIÇÃO DE FASE MÓVEL NA ORDEM EM QUE FORAM TESTADOS.....	46
TABELA 1 - CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E CAROTENOIDES TOTAIS OBTIDAS NAS DIVERSAS COMBINAÇÕES DOS NÍVEIS DOS FATORES pH, TEMPERATURA, VELOCIDADE DE AGITAÇÃO E TEMPO DE CULTIVO.....	68
TABELA 2 - EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E CAROTENOIDES TOTAIS.....	71
TABELA 3 - VALORES DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA E PRODUTIVIDADE EM CAROTENOIDES TOTAIS OBTIDOS NO CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO <i>Halorubrum saccharovorum</i> NA TEMPERATURA DE 37°C E VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DE 150 rpm	80

LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

APCI - Ionização Química à Pressão Atmosférica

ATCC - American Type Culture Collection

CCD - Cromatografia em camada delgada

CDCl_3 - Clorofórmio Deuterado

CLAE - Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

CLAE-EM - Cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas

CLAE-EM/EM - Cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas sequencial

CUR - *Curtain gas* ou gás de interface

ESI - Ionização por *electrospray*

GS1 - *Ion source gas 1* ou gás de nebulização

NC - *Needle current* ou corrente aplicada na agulha corona

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMN 1D - Ressonância magnética nuclear unidimensional

RMN 2D - Ressonância magnética nuclear bidimensional

RMN de ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

TEM - Temperature ou temperatura

TMS - Tetrametilsilano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS DO DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i>	19
3.2 CAROTENOIDES.....	21
3.2.1 Carotenoides produzidos por bactérias halofílicas do domínio <i>Archaea</i>	23
3.3 CULTIVOS DE BACTÉRIAS HALOFÍLICAS DO DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i> PARA A OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES.....	28
3.4 BACTÉRIA EXTREMÓFILA <i>Halorubrum saccharovorum</i>	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 BACTÉRIA	36
4.2 CULTIVOS DA BACTÉRIA <i>Halorubrum saccharovorum</i>	36
4.2.1 Cultivos para a obtenção de células pigmentadas	37
4.2.2 Cultivos para a verificação do efeito de diferentes condições na formação de biomassa e carotenoides totais	37
4.2.3 Cultivos para a verificação da formação de biomassa e carotenoides totais em função do tempo.....	39
4.3 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS	39
4.4 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES	40
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	41
4.5.1 Medida de valores de pH.....	41
4.5.2 Determinação da concentração celular	42
4.5.3 Determinação da produtividade em biomassa	42
4.5.4 Determinação do espectro de absorção nas regiões do ultravioleta e visível ..	43
4.5.5 Determinação da concentração de carotenoides totais.....	43
4.5.6 Determinação da produtividade em carotenoides totais.....	44
4.5.7 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)	45
4.5.8 Análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas (CLAE-EM)	45
4.5.9 Análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹ H).....	47
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES	49
5.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	49
5.3 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL....	51
5.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HIFENADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM).....	53
5.5 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE ¹ H).....	64
5.6 CULTIVOS PARA A VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES NA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E CAROTENOIDES TOTAIS.....	66
5.7 CULTIVOS PARA A VERIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E CAROTENOIDES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO	78

6 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides têm despertado crescente interesse devido às suas diferentes funções. Em animais e humanos, são precursores da vitamina A. Em humanos, contribuem para a prevenção e proteção contra doenças como o câncer e problemas cardíacos. Na indústria, os carotenoides são utilizados como suplemento de nutrientes, corantes e fragrâncias, assim como na ração animal (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012).

Mais de 750 carotenoides foram isolados de fontes naturais e alguns, como a cantaxantina, podem ser produzidos por síntese química. Entretanto, atualmente, os métodos de síntese química para a obtenção de carotenoides usados como aditivos em alimentos têm sido estritamente regulados. Além disso, alguns dos subprodutos resultantes desses processos químicos podem apresentar efeitos indesejados quando consumidos. Dessa forma, crescentes esforços veem sendo empreendidos no sentido de buscar fontes naturais de carotenoides incluindo os processos biotecnológicos (LUNA-FLORES *et al.*, 2010; PAPAIOANNOU; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2010; MAROVA *et al.*, 2012; CHRISTAKI *et al.*, 2013).

Diversos micro-organismos, como algas, leveduras e bactérias são capazes de produzir pigmentos carotenoides. Apesar da variedade das fontes naturais e sintéticas de carotenoides, somente poucos, como o β -caroteno e a astaxantina, são produzidos comercialmente por cultivo microbiano (PAPAIOANNOU; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2010). A utilização comercial de micro-organismos com potencial biotecnológico para produzir carotenoides é limitado pelo alto custo de produção. Entretanto, os custos da produção de carotenoides, por via microbiana, podem ser minimizados pelo aumento do rendimento destes pigmentos produzidos por micro-organismos, pelo uso de subprodutos industriais baratos como fontes de nutrientes, pela utilização de novos micro-organismos produtores e/ou pela otimização das condições de produção (MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2008; MAROVA *et al.*, 2012).

As bactérias extremamente halofílicas, como as pertencentes à família *Halobacteriaceae*, do domínio *Archaea*, são promitentes produtoras de carotenoides com ótima inter-relação custo-benefício, visto que essas bactérias apresentam

vantagens tanto para o seu cultivo como para a extração dos carotenoides. Isso porque o cultivo das bactérias halofílicas em meios com alta concentração de cloreto de sódio evita a contaminação por outros micro-organismos e os procedimentos para extração e purificação dos carotenoides parecem ser mais simples que aqueles de outras fontes, pois a lise das células para a liberação dos pigmentos é realizada espontaneamente em água (YACHAI, 2009).

Os carotenoides produzidos pela bactéria halofílica *Halorubrum saccharovorum* ainda não foram identificados por técnicas como a cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear de hidrogênio, mas somente por técnicas como a espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (TOMLINSON; HOCHSTEIN, 1976; KUSHWAHA *et al.*, 1982; TINDALL, 1990). Além disso, a bactéria *Halorubrum saccharovorum* não foi cultivada para a obtenção de carotenoides ou para a otimização da produção desses pigmentos. Os cultivos descritos na literatura foram realizados para o estudo da composição lipídica do micro-organismo visando a sua reclassificação taxonômica.

Dessa forma, a bactéria *Halorubrum saccharovorum*, membro da família *Halobacteriaceae*, é uma potencial produtora industrial de pigmentos carotenoides, os quais poderão ser obtidos com vantagens que podem revelar melhor inter-relação custo-benefício que outros micro-organismos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Cultivar a bactéria *Halorubrum saccharovorum* visando à obtenção de carotenoides.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter células pigmentadas da bactéria *Halorubrum saccharovorum*.
- Testar diferentes solventes para a extração de carotenoides das células secas do micro-organismo.
- Analisar a composição de carotenoides no extrato obtido das células secas do micro-organismo utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas.
- Verificar o efeito dos fatores pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de cultivo na formação de biomassa e carotenoides pela bactéria *Halorubrum saccharovorum*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS DO DOMÍNIO *ARCHAEA*

O domínio *Archaea* é formado principalmente por micro-organismos extremófilos, isto é, que não apenas toleram, mas crescem otimamente em ambientes considerados inóspitos para a vida, como fontes termais, regiões de temperaturas baixas, de extremos de pH e excessivamente salgadas (CARDOSO *et al.*, 2003). Porém, se sabe atualmente que os micro-organismos do domínio *Archaea* podem habitar também ambientes amenos, como oceanos, solos e, até mesmo, a flora intestinal (CALO; EICHLER, 2011).

Esse domínio inclui micro-organismos termófilos - capazes de habitar regiões com altas temperaturas, inclusive superiores a 100°C -, acidófilos - que podem crescer em ambientes de pH baixo, até mesmo aqueles com pH inferior a 0 -, halofílicos - capazes de habitar regiões de alta salinidade, que apresentam até 5,5 M de cloreto de sódio (equivalente a 32%, o limite de saturação para este sal) -, assim como micro-organismos que crescem em regiões de temperatura inferiores a 0°C e de pH de cerca de 10. Esse domínio inclui ainda as bactérias metanogênicas produtoras de metano (MADIGAN *et al.*, 2012a).

As bactérias do domínio *Archaea* apresentam diferenças estruturais importantes em relação àquelas do domínio *Bacteria*, destacando-se os lipídios da membrana citoplasmática e a composição da parede celular. Os lipídios da membrana de *Archaea* apresentam ligação éter, ao invés de ligação éster, entre o glicerol e as cadeias laterais hidrofóbicas, as quais são compostas por unidades repetitivas do hidrocarboneto isopreno em substituição aos ácidos graxos. Os principais lipídios são glicerol diéteres que apresentam cadeias laterais com 20 átomos de carbono (grupo fitanil) e diglicerol tetraéteres, que apresentam cadeias laterais com 40 átomos de carbono. Essas estruturas podem formar membranas lipídicas em bicamada ou monocamada, respectivamente. Esta última, por ser bastante resistente à separação, é amplamente distribuída nas bactérias hipertermófilas, nas quais o calor poderia separar as bicamadas lipídicas, promovendo a lise celular (BRITTON, 1995a; MADIGAN *et al.*, 2012a).

Já a parede celular das bactérias do domínio *Archaea* não contém peptidoglicano. Em vez disso, apresenta uma variedade de compostos químicos, como polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas. Por exemplo, bactérias halofílicas extremas apresentam parede celular composta por ácido glicurônico, ácido urônico, galactosamina, acetato e sulfato. Os grupos sulfato, como possuem carga negativa, ligam-se ao íon sódio presente em alta concentração no habitat dessas bactérias, auxiliando na estabilização da parede celular em ambientes tão polares. Essas bactérias podem apresentar, ainda, a camada S, uma camada superficial paracrística - constituída por proteínas ou glicoproteínas - que se organiza em várias simetrias, como hexagonal, tetragonal ou trimérica, dependendo do número e da estrutura das subunidades a partir das quais são formadas. Essa camada, além de representar um reforço estrutural, pode atuar como uma barreira seletiva, permitindo a passagem somente de substâncias de baixa massa molecular, ou pode atuar na retenção de proteínas próximo à superfície celular (MADIGAN *et al.*, 2012b).

As características desses organismos, adaptados a ambientes extremos, os tornam atraentes para a indústria, que pode utilizá-los para a obtenção de bioprodutos em condições adversas que, frequentemente, ocorrem em processos industriais (SCHIRALDI; GIULIANO; DE ROSA, 2002; CARDOSO *et al.*, 2003). Assim, as bactérias termofílicas podem ser utilizadas em reações enzimáticas que necessitem de temperaturas superiores a 45°C e concentrações de solventes orgânicos superiores a 10% (COWAN, 1992).

As bactérias metanogênicas do domínio *Archaea* podem ser usadas no tratamento de esgoto e de resíduos agrícolas, urbanos e industriais, sendo que o metano gerado nestes processos pode ser empregado como biogás (COWAN, 1992; SCHIRALDI; GIULIANO; DE ROSA, 2002).

Já as bactérias halofílicas, pertencentes à família *Halobacteriaceae*, são capazes de fornecer lipídios para serem usados como aditivo alimentar ou como lipossomas em sistemas de liberação de drogas, genes ou agentes para visualização de cânceres. Além disso, podem ser uma fonte de enzimas como amilases, amiloglicosidases, proteases e lipases, sendo possível empregá-las em processos que requerem a degradação de macromoléculas em altas concentrações de sais. Também podem ser utilizadas na obtenção de biopolímeros como polissacarídeos e poliésteres. Os primeiros podem ser utilizados na modificação das

propriedades reológicas de sistemas aquosos e na estabilização da viscosidade de soluções atuando como agentes espessantes, geleificantes e emulsificantes, e os poliésteres podem ser empregados na produção de plásticos biodegradáveis. Essas bactérias também podem ser uma fonte de bacteriorodopsina, uma proteína integral de membrana que pode ser utilizada no processo de armazenamento de informação óptica, como a holografia, na produção de memórias de computador e na síntese de células fotoelétricas ou voltaicas (membranas artificiais capazes de captar a luz solar e usá-la para a produção de eletricidade). Além disso, são capazes de formar compostos isoprenoides como os pigmentos carotenoides (COWAN, 1992; OREN, 2002a; SCHIRALDI; GIULIANO; DE ROSA, 2002).

3.2 CAROTENOIDES

Os carotenoides são compostos responsáveis pela coloração amarelo-laranja ou laranja-vermelha de flores, como o girassol, de frutos, como o tomate e a laranja, e de raízes, como a cenoura. O nome desta última em latim, *Daucus carota*, deu origem ao nome "caroteno". A maior produção de carotenoides ocorre nos tecidos fotossintéticos de plantas e algas, sendo sua presença, geralmente, mascarada pela coloração verde da clorofila e revelada somente quando a clorofila é degradada, como nas folhas de outono (BRITTON; SYNNØVE; PFANDER, 1995).

Esses compostos podem ser encontrados ainda em micro-organismos e em animais. Estão presentes no aparato fototrófico das bactérias fototróficas e são responsáveis pela cor amarela, laranja ou vermelha em bactérias, fungos e leveduras não-fototróficos. Em animais, como a ave flamingo e o peixe salmão, a coloração é derivada da alimentação, visto que animais são incapazes de realizar a biossíntese de carotenoides (BRITTON; SYNNØVE; PFANDER, 1995).

Os carotenoides consistem em oito unidades de isopreno com ligações duplas conjugadas. A estrutura básica acíclica, contendo 40 átomos de carbono, pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização, oxidação ou, ainda, pela adição de mais unidades de isopreno, originando, neste último caso, carotenoides contendo 45 ou 50 átomos de carbono (DAVIES, 1976).

Os carotenoides são classificados como carotenos e xantofilas. Os carotenos são compostos somente por átomos de carbono e hidrogênio, podem ser representados pelo β -caroteno e pelo licopeno, por exemplo. As xantofilas, por sua vez, são os derivados oxigenados dos carotenos e podem conter grupos funcionais hidroxila, carbonila, metoxila, carboxila e epoxi, podendo ser citados como exemplos a zeaxantina, a cantaxantina, a espiriloxantina, a torularodina e a violaxantina (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012). As estruturas dos carotenoides citados são mostradas na figura 1.

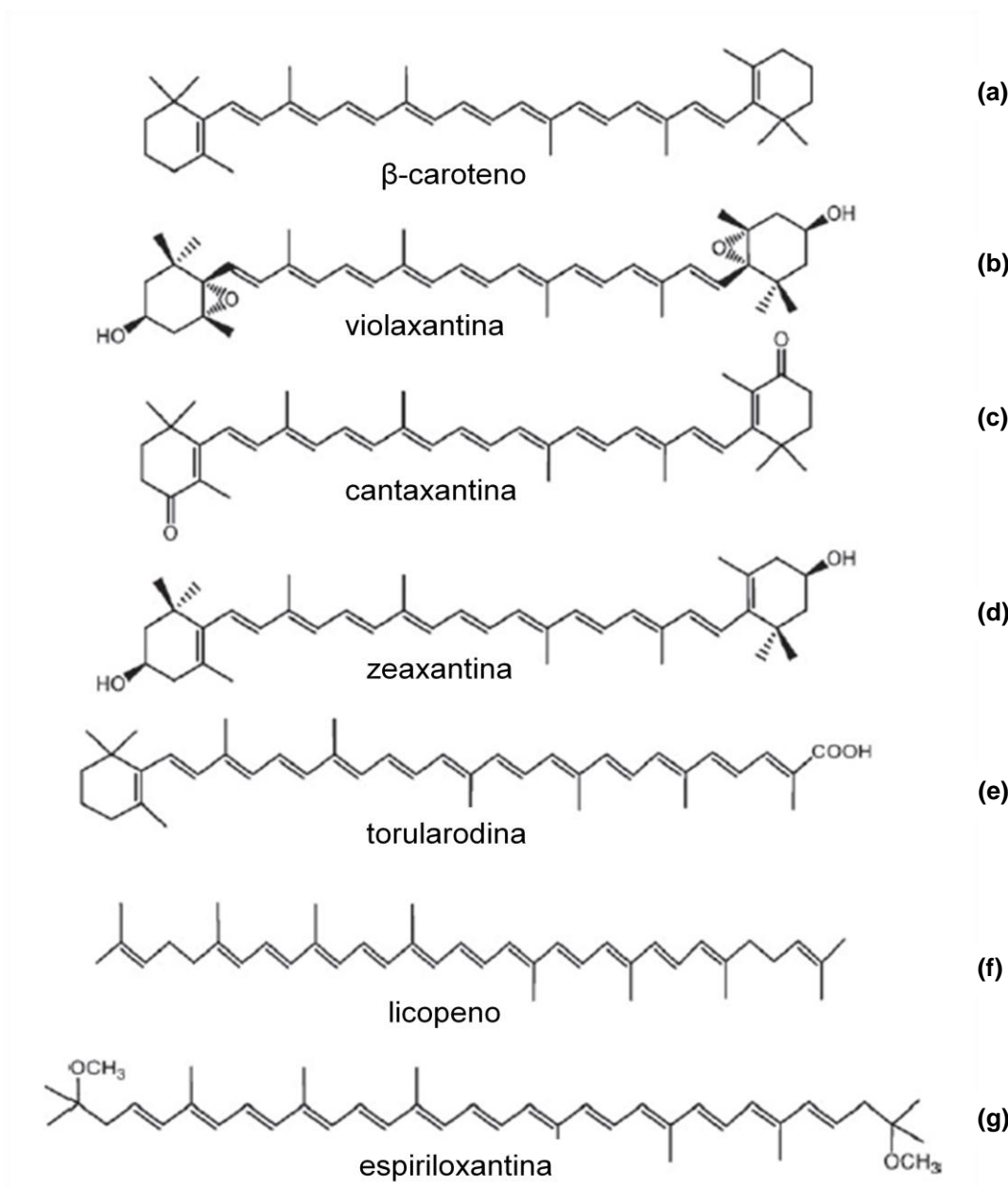


FIGURA 1 - ESTRUTURAS DE DOIS CAROTENOS, O β -CAROTENO (a) E O LICOPENO (f), E DE CINCO XANTOFILAS, A VIOLAXANTINA (b), A CANTAXANTINA (c), A ZEAXANTINA (d), A TORULARODINA (e) E A ESPIRILOXANTINA (g).
 FONTE: RIVERA; CANELA-GARAYOA (2012)

Os carotenoides têm despertado atenção devido às suas várias funções na saúde humana e na indústria. Alguns carotenos, principalmente o β -caroteno, são precursores da vitamina A, a qual desempenha funções em diversas atividades metabólicas e fisiológicas, sendo requerida para a visão, a hematopoiese, o desenvolvimento embrionário, a diferenciação celular da pele, o funcionamento do sistema imune e a transcrição de genes (NISHINO *et al.*, 2009; CHAPMAN, 2012). Além disso, evidências epidemiológicas e resultados experimentais sugerem que, devido às suas propriedades antioxidantes, os carotenoides podem prevenir doenças como aterosclerose, catarata, degeneração macular relacionada à idade, esclerose múltipla, anormalidades ósseas e cânceres, que são possivelmente desenvolvidas devido ao dano causado por radicais livres (VACHALI; BHOSALE; BERNSTEIN, 2012). Vários carotenoides, como o α -caroteno, a luteína, o licopeno e a β -criptoxantina são promissores agentes anticarcinogênicos, inclusive há estudos que buscam relacionar o licopeno com a prevenção e tratamento do câncer de próstata (NISHINO *et al.*, 2009; ILIC; MISSO, 2012).

Na indústria, os carotenoides são tradicionalmente utilizados como corantes em alimentos e bebidas, como sucos de frutas, refrigerantes, confeitos, margarinas e produtos lácteos, bem como em ração animal. Têm o objetivo de realçar a coloração de ovos, pássaros, peixes e crustáceos, tornando-os mais atrativos aos consumidores (VÍLCHEZ *et al.*, 2011; CHRISTAKI *et al.*, 2013). Os carotenoides são usados ainda como suplementos de vitaminas e como nutracêuticos, devido às funções na saúde humana (CAMPO; GARCÍA-GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007). São, também, empregados em produtos cosméticos devido à capacidade desses pigmentos de absorver a radiação ultravioleta excessiva, de inativar radicais livres e de fornecer uma coloração bonita à pele (IGIELSKA-KALWAT; WAWRZYNCZAK; NOWAK, 2012).

3.2.1 Carotenoides produzidos por bactérias halófilas do domínio *Archaea*

O carotenoide característico das bactérias halófilas, do domínio *Archaea*, é a bacterioruberina (KELLY; JENSEN, 1967; KELLY; NORGDARD; LIAAEN-JENSEN, 1970; KUSHWAHA; KRAMER; KATES, 1975; RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1992,

1995; ASKER; AWAD; OHTA, 2002; FANG *et al.*, 2010). Esse carotenoide e seus derivados, a monoanidrobacterioruberina, a bisanidrobacterioruberina e a trisanidrobacterioruberina, apresentam 50 átomos de carbono e podem ser encontrados na forma de isômeros geométricos *trans* e *cis* (5-*cis*-bacterioruberina, 9-*cis*-bacterioruberina, 13-*cis*-bacterioruberina, 15-*cis*-bacterioruberina, 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina) (RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1992; BRITTON; SYNNØVE; PFANDER, 1995). As estruturas da bacterioruberina e de seus derivados são mostradas na figura 2.

O pigmento bacterioruberina desempenha importantes funções biológicas nos micro-organismos da família *Halobacteriaceae*. Dessa forma, atua como um reforço da membrana celular, uma vez que aumenta a rigidez da membrana e diminui a permeabilidade à água (LAZRAC *et al.*, 1988; FANG *et al.*, 2010). Além disso, protege os micro-organismos de agentes que lesam o DNA, como a radiação ionizante, a radiação ultravioleta e o peróxido de hidrogênio (OREN, 2002c; SINGH; GABANI, 2011).

A importância da bacterioruberina foi mostrada no trabalho de Mandelli *et al.* (2012), no qual foi realizado um estudo sobre a atividade antioxidante dos carotenoides das bactérias halofílicas *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarum*, pertencentes ao domínio *Archaea*. Os carotenoides dessas bactérias foram identificados como sendo a bacterioruberina e seus derivados e demonstraram maior atividade antioxidante que compostos como o α -tocoferol, o ácido ascórbico, a rutina e a zeaxantina, que são comumente conhecidos por suas propriedades antioxidantes.

Portanto, a bacterioruberina e seus derivados apresentam uso promissor como corante e antioxidante nas indústrias farmacêutica e alimentícia, assim como podem representar um uso potencial em humanos para reparar danos ao DNA, causados por radiação ultravioleta e, conseqüentemente, prevenir contra o câncer de pele (SINGH; GABANI, 2011; MANDELLI *et al.*, 2012).

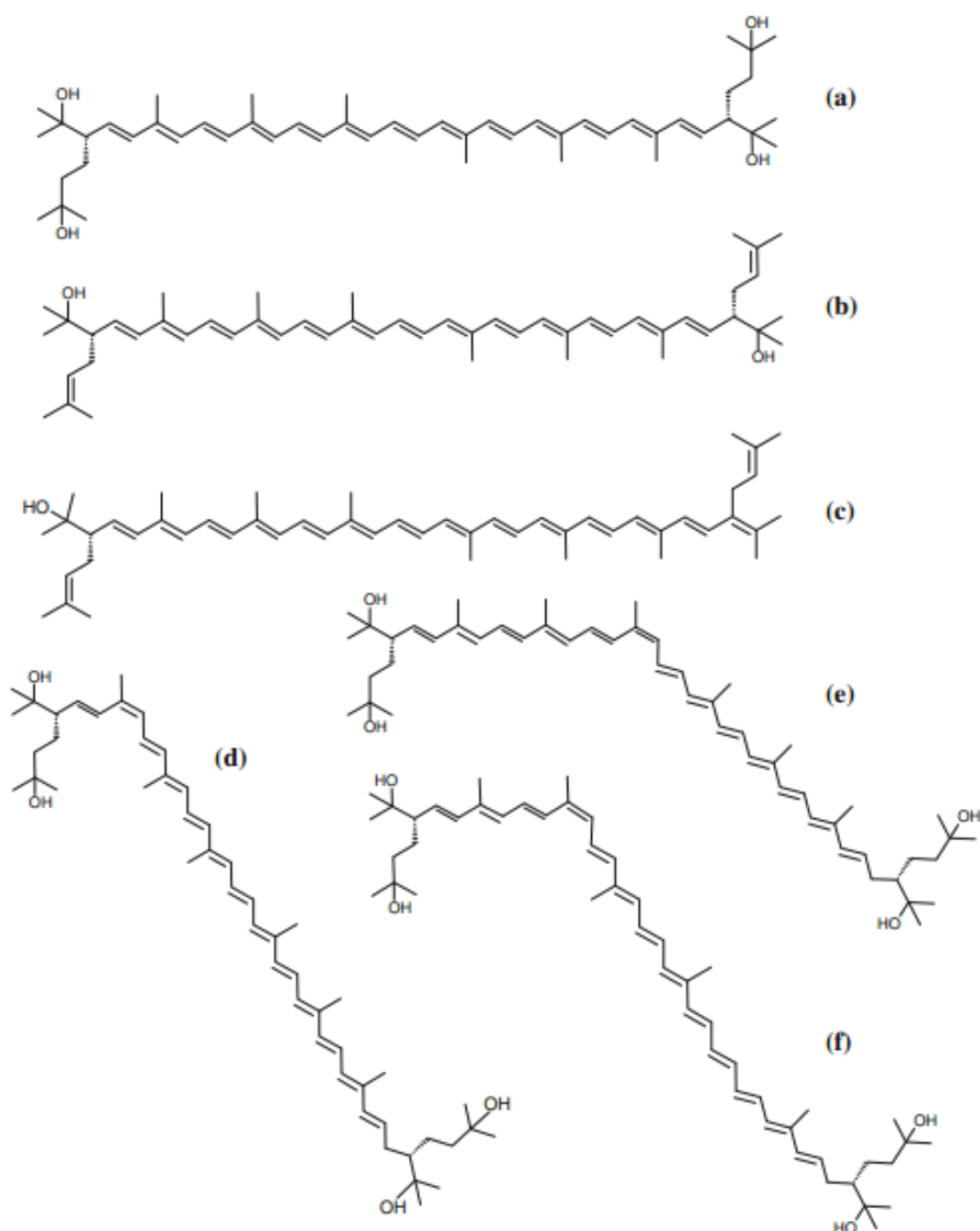


FIGURA 2 - BACTERIORUBERINA E SEUS DERIVADOS: (a) *trans*-BACTERIORUBERINA, (b) BISANIDROBACTERIORUBERINA, (c) TRISANIDROBACTERIORUBERINA, (d) 5-*cis*-BACTERIORUBERINA, (e) 13-*cis*-BACTERIORUBERINA, (f) 9-*cis*-BACTERIORUBERINA

FONTE: MANDELLI *et al.* (2012)

As bactérias halofílicas do domínio *Archaea* são capazes de produzir ainda outros carotenoides, como os descritos no quadro 1, a seguir.

Micro-organismo	Carotenoides produzidos	Fonte
<i>Haloarcula hispanica</i>	3-hidroxi-equinenona e <i>trans</i> -astaxantina	CALO <i>et al.</i> , 1995
<i>Haloarcula marismortui</i>	Esqualenos, vitamina MK-8, bacterioruberina, monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina, β -caroteno, licopeno	EVANS; KUSHWAHA; KATES, 1980; STIEHL; RULLKÖTTER; NISSENBAUM, 2005
<i>Halobacterium cutirubrum</i>	Esqualenos, fitoeno, <i>cis</i> - e <i>trans</i> -fitofluenos, <i>neo</i> - α -caroteno, β -caroteno e <i>neo</i> - β -caroteno, licopeno, licoperseno, bacterioruberina, monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina e <i>neo</i> -bacterioruberina	KUSHWAHA <i>et al.</i> , 1972; KUSHWAHA; KRAMER; KATES, 1975
<i>Halobacterium salinarum</i>	Bacterioruberina, monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina, trisanidrobacterioruberina, tetra-anidrobacterioruberina, β -caroteno, 3-hidroxi-equinenona e <i>trans</i> -astaxantina	KELLY; NORGARD; LIAAEN-JENSEN, 1970; CALO <i>et al.</i> , 1995
<i>Haloferax alexandrinus</i>	β -caroteno, cantaxantina, 3-hidroxi-equinenona e bacterioruberina	ASKER; OHTA, 1999
<i>Haloferax mediterranei</i>	Bacterioruberina, monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina, 2-isopentenil-3,4-dehidrorodopina, 3-hidroxi-equinenona	CALO <i>et al.</i> , 1995; FANG <i>et al.</i> , 2010
<i>Haloferax volcanii</i>	Bacterioruberina, monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina, 2-isopentenil-3,4-dehidrorodopina, licopeno, 3',4'-dihidromonoanidrobacterioruberina, haloxantina e 3,4-epoximonoanidrobacterioruberina	RØNNEKLEIV <i>et al.</i> , 1995; RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1995
<i>Haloquadratum walsbyi</i>	caroteno, bacterioruberina, esqualeno e vitamina MK-8	LOBASSO <i>et al.</i> , 2008

QUADRO 1 - CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS HALOFÍLICAS DO DOMÍNIO ARCHAEA

Os carotenoides, produzidos pelas bactérias halofílicas do domínio *Archaea*, são biossintetizados pela via do mevalonato, em que se considera que unidades com 5 átomos de carbono se condensam para formar a estrutura isoprenoide dos carotenoides e outros lipídios (FIGURA 3). As etapas dessa via ainda estão em estudo, assim como as enzimas responsáveis por essas etapas (FALB *et al.*, 2008).

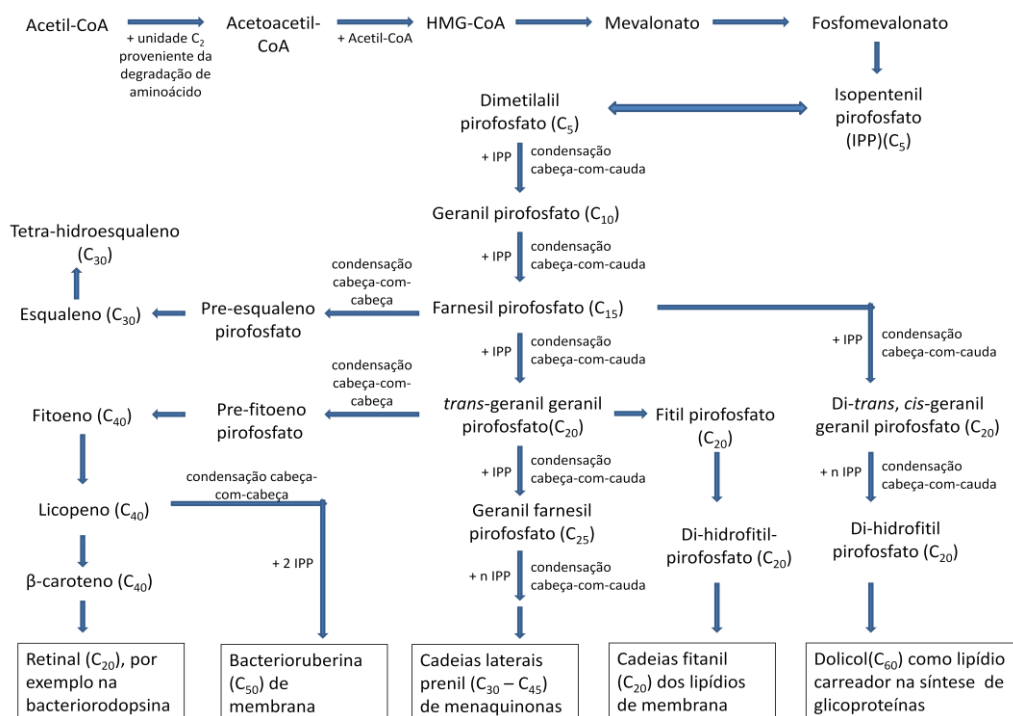


FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DE CAROTENOIDES E OUTROS LIPÍDIOS NAS BACTÉRIAS HALOFÍLICAS

FONTE: FALB *et al.* modificado (2008)

NOTA: CoA = coenzima A; HMG = β -hidroxi- β -metilglutaril; C_n = molécula com "n" átomos de carbono; IPP = isopentenil pirofosfato.

A formação de carotenoides acíclicos com 50 átomos de carbono, como a bacterioruberina, a partir do licopeno (FIGURA 4), ocorre pela adição de grupos prenil nas extremidades da molécula de licopeno e conseqüente acréscimo de grupos hidroxila na cadeia lateral (PFANDER, 1994).

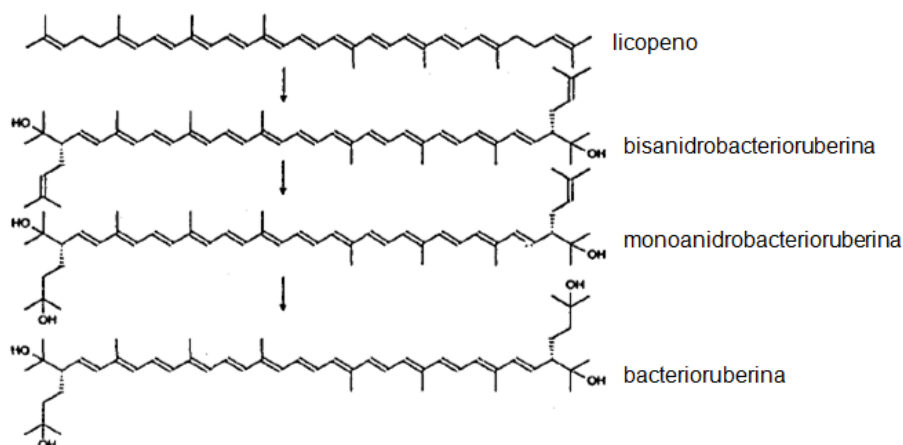


FIGURA 4 - BIOSÍNTESE DA BACTERIORUBERINA NAS BACTÉRIAS HALOFÍLICAS A PARTIR DO LICOPENO

FONTE: PFANDER modificado (1994)

3.3 CULTIVOS DE BACTÉRIAS HALOFÍLICAS DO DOMÍNIO *ARCHAEA* PARA A OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES

A maioria dos trabalhos existentes na literatura sobre o cultivo de bactérias halofílicas do domínio *Archaea* tratam da pesquisa e elucidação da composição lipídica destes micro-organismos. Assim, há poucos trabalhos referentes ao cultivo destas bactérias halofílicas para a obtenção de carotenoides ou para otimização da produção desses pigmentos.

A bactéria halofílica, inicialmente denominada R-4 e posteriormente identificada como *Haloferax mediterranei* ATCC 33500, e a bactéria *Halobacterium cutirubrum* foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer de 4 L, contendo 1 L do meio de cultivo composto por 194 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 16 g.L⁻¹ de cloreto de magnésio, 24 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio, 1 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio, 5 g.L⁻¹ de cloreto de potássio, 0,2 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 0,5 g.L⁻¹ de brometo de sódio e 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, em pH 7,3, na temperatura de 38°C, sob agitação magnética por 4 dias. Avaliou-se o efeito das concentrações de cloreto de sódio de 15%, 20%, 25% e 35% na produção de carotenoides e outros compostos isoprenoides. A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia em camada delgada, usando placas de sílica gel H como fase estacionária e clorofórmio/metanol (93:7, v/v), éter de petróleo/éter dietílico (99:1, v/v) ou éter de petróleo/éter dietílico (99,5:0,5, v/v) como fase móvel. Os isoprenoides coloridos foram detectados visualmente e os incolores, com vapor de iodo. Os carotenoides separados foram removidos das placas de cromatografia, identificados pelo espectro na região do visível e quantificados espectrofotometricamente. A bactéria R-4 produziu a maior concentração de bacterioruberina e seus derivados de 505 µg por grama de proteína celular na concentração de 15% de cloreto de sódio, enquanto a bactéria *Halobacterium cutirubrum* produziu as maiores concentrações destes carotenoides de 1754 µg, 1622 µg e 1517 µg por grama de proteína celular nas concentrações de 20%, 25% e 35% de cloreto de sódio, respectivamente. Após o processo, essa bactéria não formou carotenoides na concentração de 15% de cloreto de sódio. Desse modo, a bactéria *Halobacterium cutirubrum* requer maiores concentrações de cloreto de sódio para crescimento e formação de carotenoides. O aumento da concentração de sal de 15% para 30% não alterou significativamente a

concentração total do composto isoprenoide esqualeno na bactéria R-4, mas afetou consideravelmente a proporção entre o esqualeno e os compostos di-hidroesqualeno e tetra-hidroesqualeno. Quanto à vitamina MK-8, seu conteúdo nas células crescidas da bactéria R-4 nas concentrações de sal de 20% a 35% foi significativamente menor do que na concentração de 15% (KUSHWAHA *et al.*, 1982; MURIANA; ALVAREZ-OSSORIO; RELIMPIO, 1991).

Em outro trabalho, a bactéria halofílica *Haloferax mediterranei* ATCC 33500, foi cultivada por 72 horas no meio sintético contendo 20% de cloreto de sódio, 0,5% de glucose e 0,05 M de tampão Tris-HCl (pH 7,2), assim como no mesmo meio, porém com concentrações menores de cloreto de sódio de 15%, 10%, 5% e 0%. Os lipídios extraídos das células do micro-organismo foram separados por cromatografia em camada delgada e revelados por carbonização a 160°C, e as bandas referentes aos carotenoides foram quantificadas por densitometria. A identificação do pigmento foi realizada por meio do espectro de absorção na região do visível. A proporção do pigmento bacterioruberina, formado nas células do micro-organismo, foi de 1:5:9 nas concentrações de cloreto de sódio de 20%, 10% e 5%, respectivamente (D'SOUZA; ALTEKAR; D'SOUZA, 1997).

Fang *et al.* (2010) foram os primeiros a utilizar a bactéria halofílica *Haloferax mediterranei* para um cultivo em dois estágios. O primeiro estágio foi realizado para a obtenção de células a serem usadas para a produção de carotenoides no segundo estágio. Assim, o primeiro estágio ocorreu em biorreator de 20 L, contendo 15 L de meio de cultivo basal composto por 156 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 13 g.L⁻¹ de cloreto de magnésio hexa-hidratado, 20 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 1 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio di-hidratado, 4 g.L⁻¹ de cloreto de potássio, 0,2 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 0,5 g.L⁻¹ de brometo de sódio e 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, adicionado de 10 g.L⁻¹ de glucose, em pH 7 e aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Já o segundo estágio ocorreu em frascos de Hinton de 500 mL, contendo o meio basal composto por 20% (p/v) de cloreto de sódio, 0,1% (p/v) de glucose e 50 mM de Tris-HCl, em pH 7,2. A temperatura de incubação foi de 37°C e a velocidade de agitação, de 120 rpm em ambos os estágios. A separação dos pigmentos do extrato foi realizada por cromatografia em camada delgada, utilizando placas de sílica Merck 5553 como fase estacionária e 50% de acetona em n-heptano (v/v) como fase móvel. As bandas obtidas, após serem analisadas por densitometria, foram removidas das placas e analisadas por cromatografia em fase

líquida de alta eficiência, utilizando coluna SphereClone Si[®] (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel composta por 20% de acetato de etila em n-hexano e metanol, eluição gradiente, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 495 nm. Foram obtidos também os espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e visível. O rendimento de carotenoides totais nos extratos foi determinado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 494 nm. Foram avaliados os efeitos de várias concentrações de cloreto de sódio (5%, 10% e 20%), de sulfato de magnésio (0%, 2%, 8%, 10%, 12%, 16% e 20%), de glucose (0,1%, 0,5%, 1% e 2%) e de acetato de sódio (0,1%, 0,5%, 1% e 2%), no rendimento de carotenoides, assim como os efeitos da concentração de células no inóculo do segundo estágio e do tempo de cultivo desse estágio na eficiência de produção de pigmentos. A concentração máxima de carotenoides, no segundo estágio, foi obtida na concentração de 5% de cloreto de sódio, de 8% de sulfato de magnésio, o qual foi adicionado para aumentar a pressão osmótica do meio de cultivo, e de 0,1% de acetato de sódio, que foi usado como fonte de carbono em substituição à glucose, cujo rendimento em carotenoides foi menor em todas as concentrações testadas. A maior eficiência na produção de carotenoides foi obtida no cultivo de 48 horas, realizado com as células do biorreator, cultivadas por 48 horas, apesar da maior concentração de carotenoides ter sido observada após 48 horas de cultivo com o inóculo de 80 horas. Os pigmentos carotenoides identificados foram: a bacterioruberina, a monoanidrobacterioruberina, a bisanidrobacterioruberina e a 2-isopentenil-3,4-dehidrorodopina.

O cultivo da bactéria TM, posteriormente identificada como a bactéria halofílica *Haloferax alexandrinus*, foi realizado em frascos de 500 mL contendo o meio complexo composto 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 7,5 g.L⁻¹ de casaminoácidos, 250 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 40 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 2 g.L⁻¹ de cloreto de potássio e 3 g.L⁻¹ de citrato trissódico, em pH 7,2, na temperatura de 37°C, velocidade de agitação de 240 rpm e tempo de cultivo de 7 dias. O cultivo foi otimizado e foram avaliados os seguintes efeitos no rendimento de carotenoides: concentrações de cloreto de sódio (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 35%), de sulfato de magnésio (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6%), de cloreto de magnésio (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6%), de sulfato de sódio (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6%), de cloreto de potássio (0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% e 1%), ausência e presença de elementos-traço (2,3 µg.mL⁻¹ de cloreto ferroso tetra-

hidratado, $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloreto de cálcio hepta-hidratado, $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de manganês hidratado, $0,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de zinco e $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de cobre penta-hidratado), assim como o tempo de cultivo (1 a 8 dias), a temperatura (15°C a 55°C em incrementos de 5°C), o pH (4,5 a 9), a ausência ou presença de agitação (240 rpm), volume de meio (100 mL, 200 mL, 300 mL e 400 mL em frascos de Erlenmeyer de 500 mL) e iluminação. O conteúdo total de carotenoides nos extratos obtidos foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 490 nm. Os pigmentos vermelhos obtidos foram separados e quantificados por cromatografia em fase líquida de alta eficiência, utilizando coluna de fase normal (Inertsil[®], 250 x 4,6 mm), fase móvel composta por hexano/acetato de etila (50:50, v/v), eluição gradiente, fluxo de 1 mL.min^{-1} e detecção a 490 nm. A identificação dos carotenoides foi realizada pela comparação com padrões de β -caroteno e cantaxantina, assim como pelo espectro de absorção característico da bacterioruberina. A maior produção de carotenoides ocorreu após 6 dias de cultivo nas concentrações de 25% de cloreto de sódio, de 4% de sulfato de magnésio e de 0,2% de cloreto de potássio, assim como na presença de elementos-traço, na temperatura de 37°C , em pH 7,2, na presença de agitação e em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio. A substituição de sulfato de magnésio por cloreto de magnésio evidenciou baixo crescimento celular e muito pouco rendimento de carotenoides e a substituição por sulfato de sódio evidenciou nenhum crescimento do micro-organismo. Verificou-se também que a iluminação não afetou a produção de carotenoides. Assim, sob condições ótimas, a bactéria TM produziu 2,06 mg de carotenoides totais por grama de células secas, sendo 2,9% de β -caroteno, 33,9% de cantaxantina e 63,2% de bacterioruberina (ASKER; OHTA, 1999).

A mesma espécie *Haloferax alexandrinus* TM (JCM 10717) foi cultivada a 37°C por 7 dias, no meio padrão de crescimento, contendo 10 g.L^{-1} de extrato de levedura, $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de casaminoácidos, 250 g.L^{-1} de cloreto de sódio, 40 g.L^{-1} de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 2 g.L^{-1} de cloreto de potássio, 3 g.L^{-1} de citrato trissódico e 10 mL de uma solução de elementos-traço, que era composta por $23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloreto ferroso tetra-hidratado, $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloreto de cálcio hepta-hidratado, $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de manganês hidratado, $4,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de zinco e $0,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfato de cobre penta-hidratado, em pH 7,2. Foi avaliado o efeito das concentrações de cloreto de sódio de 10%, 15%, 20% e 25% na produção

de carotenoides. A identificação e a quantificação dos carotenoides formados foram realizadas conforme descrito anteriormente por Asker e Ohta (1999). As células obtidas de cultivos de 6 L em condições ótimas, também determinadas por Asker e Ohta (1999), produziram 2060 µg de carotenoides totais por grama de células secas, sendo 60,56 µg de β-caroteno, 80,34 µg de 3-hidroxi-equinenona, 700,4 µg de cantaxantina e 1212,94 µg de bacterioruberina e seus derivados por grama de células secas. A partir de cultivos de 6 L do micro-organismo com diferentes concentrações de cloreto de sódio, verificou-se que na concentração de 10% de cloreto de sódio não houve estímulo da produção de carotenoides, enquanto a máxima produtividade de carotenoides foi observada na concentração de 25% de cloreto de sódio. As células apresentaram aumento na proporção de bacterioruberinas, quando a concentração de cloreto de sódio foi diminuída para 15%. Entretanto, o aumento da concentração de cloreto de sódio para 25% provocou a diminuição na produtividade de bacterioruberinas e o aumento da produtividade de cantaxantina. Já na concentração de cloreto de sódio de 20%, houve diminuição na produtividade de bacterioruberinas e aumento na de β-caroteno (ASKER; AWAD; OHTA, 2002).

Outro trabalho de Asker e Ohta (2002) demonstrou que o cultivo da bactéria *Haloferax alexandrinus* para a obtenção de carotenoides pode ser realizado em condições não assépticas, quando altas concentrações de cloreto de sódio (20% a 25%) são utilizadas.

Outra bactéria halofílica, *Halobacterium salinarum*, cepa Oyon Moussa -16 (JCM 10927), foi cultivada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL do meio de cultivo composto por: 25% de cloreto de sódio, 0,15% de Bacto casamionóácidos, 0,03% de citrato trisódico, 0,025% de ácido glutâmico, 2% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,2% de cloreto de potássio, em pH 7,0. O cultivo ocorreu na temperatura de 37°C, sob leve agitação tanto no escuro como na presença de luz (60 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ de lâmpadas fluorescentes), assim como em alta e baixa tensão de oxigênio, esta última obtida com borbulhamento de gás nitrogênio. A análise dos pigmentos foi realizada por cromatografia em fase líquida de alta eficiência, utilizando a coluna de fase reversa µBondapak[®] C18 (8 x 100 mm), fase móvel composta por metanol/água (95:15, v/v) e metanol, eluição gradiente e fluxo de 2 mL.min⁻¹, sendo que os espectros de absorção foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 250 a 580 nm. A identificação dos carotenoides

foi realizada pela comparação com padrões de β -caroteno e retinal, assim como por meio dos comprimentos de onda de absorção máxima característicos do retinal (360 nm), da bacterioruberina (490 nm) e do β -caroteno (445 nm). Já a quantificação desses pigmentos foi determinada pelos coeficientes de absorção característicos de cada composto. A presença de luz provocou o aumento da concentração de bacterioruberina e a diminuição da concentração de β -caroteno, o que resultou em um aumento de mais de 80% na concentração de carotenoides totais. As células cultivadas na luz e em baixa tensão de oxigênio apresentaram diminuição na concentração de bacterioruberina, enquanto as células cultivadas no escuro não tiveram seu conteúdo de carotenoides modificado significativamente, tanto em baixa como em alta tensão de oxigênio. Dessa forma, a incidência de luz e a alta tensão de oxigênio promoveram a maior concentração de carotenoides totais de 15,2 nmol por 10^{10} células, sendo 10,0 nmol de bacterioruberina, 0,7 nmol de β -caroteno e 9 nmol de retinal por 10^{10} células (EL-SAYED *et al.*, 2002).

3.4 BACTÉRIA EXTREMÓFILA *Halorubrum saccharovorum*

A bactéria *Halorubrum saccharovorum* (do latim *saccharum*, açúcar, e *vorare*, comer) pertence ao domínio *Archaea* e à família *Halobacteriaceae*. Esta família é composta por 18 gêneros e 72 espécies válidas descritas (TOMLINSON; HOCHSTEIN, 1972; CATALOGUE OF LIFE, 2012). Todos os membros dessa família são halofílicos extremos e, por isso, necessitam de cloreto de sódio em concentração de pelo menos 1,5 M para o crescimento, porém, para o crescimento ótimo, precisam de cloreto de sódio em concentração de 2,0 a 4,5 M (ROBINSON *et al.*, 2005).

A bactéria halofílica *Halorubrum saccharovorum* foi isolada das salinas da área da Baía de São Francisco, no Estado da Califórnia, nos Estados Unidos da América (TOMLINSON; HOCHSTEIN, 1972). Desde tempos antigos, as salinas têm sido alvo de atenção. Sugere-se que a Primeira Praga do Egito, na qual a água do Rio Nilo adquiriu cor de sangue, refere-se à presença de águas vermelhas, que, atualmente, se sabe que são causadas por densas comunidades de micro-organismo adaptados à vida em altas concentrações de sais ou concentrações

próximas da saturação. Mais recentemente, no Mar Morto observa-se a presença de bactérias halofílicas do domínio *Archaea*, em quantidade suficiente para conferir cor vermelha à água (OREN, 2002b).

A bactéria *Halorubrum saccharovorum* caracteriza-se por um bacilo móvel, Gram negativo, medindo 0,6 - 1,25 x 2,5 μm , que necessita de pelo menos 12% de cloreto de sódio no meio em que se encontra para manter sua integridade estrutural, e é capaz de metabolizar diferentes carboidratos, produzindo ácidos. Em meio sólido, suas colônias são pequenas (menores que 2 mm), redondas, convexas, inteiras e de coloração vermelho-alaranjada. Em 1972, o pigmento identificado nessa bactéria foi a bacterioruberina, pois lisados, preparados pela suspensão das células em água destilada, exibiram um espectro de absorção apresentando três absorções máximas nos comprimentos de onda de 475, 505 e 540 nm, considerados característicos da bacterioruberina (TOMLINSON; HOCHSTEIN, 1972; KUSHWAHA *et al.*, 1982).

Não foram encontrados na literatura estudos sobre o cultivo da bactéria *Halorubrum saccharovorum* para a obtenção de carotenoides ou para a otimização da produção desses pigmentos, bem como estudos de identificação por cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos compostos isoprenoides produzidos pela bactéria *Halorubrum saccharovorum*. Os trabalhos encontrados, descritos a seguir, tratam do estudo da composição lipídica da bactéria. Naquela época, tais estudos eram realizados para a classificação taxonômica dos micro-organismos e a reclassificação da bactéria *Halorubrum saccharovorum* em um novo gênero era necessária porque ela pertencia ao gênero *Halobacterium* e apresentava composição lipídica distinta dos outros integrantes desse gênero.

Desse modo, Kushwaha *et al.* (1982) estudaram a composição lipídica da bactéria *Halorubrum saccharovorum*, demonstrando que essa bactéria apresenta compostos isoprenoides, com 30 átomos de carbono (o esqualeno, o di-hidroesqualeno e o tetrahidroesqualeno), com 40 átomos de carbono (o β -caroteno), com 50 átomos de carbono (a bacterioruberina e a monoanidrobacterioruberina) e a vitamina MK-8. A separação desses compostos foi obtida por cromatografia em camada delgada, utilizando como fase estacionária placas de sílica gel (Sil G-25) e como fase móvel clorofórmio/metanol (93:7, v/v) para a separação da

bacterioruberina e da monoanidrobacterioruberina, éter de petróleo e éter dietílico (99:1, v/v) para a separação da vitamina MK-8, do licopeno e do β -caroteno, e éter de petróleo/éter dietílico (99,5:0,5, v/v) para a separação do esqualeno, do dihidroesqualeno, do tetrahidroesqualeno, do β -caroteno e do licopeno. A identificação dos isoprenoides foi realizada pela obtenção do espectro na região do visível e a quantificação foi determinada espectrofotometricamente.

Tindall (1990) realizou um estudo comparativo da composição lipídica da bactéria *Halorubrum saccharovorum* obtida de diversas fontes, porém o trabalho enfatizou a composição em lipídios polares, como fosfolipídios e glicolipídios. O único composto isoprenoide verificado foi a vitamina MK-8, cuja identificação foi realizada por cromatografia em fase líquida de alta eficiência no comprimento de onda de 269 nm, utilizando a coluna Spherisorb (150 x 4,6 mm, 5 μ m) e fase móvel composta por metanol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIA

A bactéria *Halorubrum saccharovorum* ATCC 29252 foi adquirida da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos da América, na forma liofilizada.

A referida bactéria foi ativada no meio ATCC 876, de acordo com as instruções da ATCC. Esse meio é composto por 250,0 g.L⁻¹ de cloreto de sódio, 5,0 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 5,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20,0 g.L⁻¹ de cloreto de magnésio hexa-hidratado, 2,0 g.L⁻¹ de cloreto de potássio, 0,2 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio di-hidratado e água destilada em quantidade suficiente. O pH do meio foi ajustado para 7,6 utilizando uma solução de hidróxido de sódio 2 M (ATCC - American Type Culture Collection, 2011). Foi esterilizado em autoclave vertical, empregando-se calor úmido, a 121°C, 1 atmosfera de pressão, por um intervalo de tempo de 15 a 30 minutos, dependendo do volume de meio no frasco.

A bactéria cresceu no meio líquido ATCC 876, em estufa Tecnal, modelo TE-391, a 37°C, durante 27 horas. Foi realizada a verificação da pureza da cultura pela técnica a fresco e pela coloração de Gram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012b).

As células da cultura pura, recém-crescida, foram conservadas por congelamento, utilizando glicerol como agente crioprotetor para manter a viabilidade das células.

4.2 CULTIVOS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum*

A partir da cultura pura, recém-crescida, foi preparada uma suspensão da bactéria *Halorubrum saccharovorum*, tendo como diluente o meio líquido para crescimento. Um volume adequado dessa suspensão, recém-preparada, foi transferido para meios líquidos de cultivo. Esses meios foram utilizados para a realização dos cultivos da bactéria para a obtenção de células pigmentadas, para a

verificação do efeito de diferentes condições de cultivo na formação de biomassa e de carotenoides totais, bem como para a verificação da formação de biomassa e carotenoides totais em função do tempo de cultivo.

4.2.1 Cultivos para a obtenção de células pigmentadas

Os cultivos para a obtenção de células pigmentadas foram realizados em frascos de Erlenmeyer, preenchidos de modo a respeitar a proporção 1:5 entre o volume de meio e o volume do frasco. Esses frascos foram mantidos a 37°C e 150 rpm em agitador incubador de movimento rotatório Tecnal, modelo TE-421 ou Marconi, modelo MA 420, durante 48 horas ou 72 horas.

4.2.2 Cultivos para a verificação do efeito de diferentes condições na formação de biomassa e carotenoides totais

Um planejamento fatorial 2^4 completo foi realizado para a verificação do efeito dos fatores pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de cultivo na formação de biomassa e carotenoides totais pela bactéria. Assim, o efeito dos quatro fatores selecionados foi avaliado em dois níveis, ou seja, em dois valores diferentes de cada fator, originando 16 experimentos distintos, resultantes de todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores (QUADRO 2).

Com isso, um volume da suspensão da bactéria foi adicionado a frascos de Erlenmeyer, de 125 mL de capacidade, contendo 25 mL de meio líquido ATCC 876, em pH 4,5, ajustado com solução de ácido sulfúrico 2 M, ou pH 7,5 ajustado com solução de hidróxido de sódio 2 M, visando obter a concentração inicial de células entre 0,1 e 0,2 de medida de densidade óptica a 540 nm. Como o experimento foi realizado em triplicata, 6 frascos contendo meio de pH 4,5 e 6 frascos, meio de pH 7,5 foram mantidos na incubadora com agitação orbital Tecnal a 37°C e a 100 rpm. Da mesma forma, 6 frascos contendo meio de pH 4,5 e 6 frascos contendo meio de pH 7,5 foram mantidos na incubadora com agitação orbital Novatecnica a 25°C e a

100 rpm. Após 48 horas e 72 horas de cultivo, 3 cultivos com pH inicial 4,5 e 7,5 foram retirados das incubadoras. O procedimento foi realizado novamente, porém os frascos foram mantidos na incubadora Tecnal a 37°C e 200 rpm ou na incubadora Novatecnica a 25°C e a 200 rpm. Os controles realizados nos cultivos foram de pH, concentração de células secas e de carotenoides totais.

Fator		Nível		
		-	+	
1 pH		4,5	7,5	
2 Temperatura (°C)		25	37	
3 Velocidade de agitação (rpm)		100	200	
4 Tempo de cultivo (horas)		48	72	
Ensaio	pH	Temperatura	Velocidade de agitação	Tempo de cultivo
1	-	-	-	-
2	-	-	-	+
3	-	-	+	-
4	-	-	+	+
5	-	+	-	-
6	-	+	-	+
7	-	+	+	-
8	-	+	+	+
9	+	-	-	-
10	+	-	-	+
11	+	-	+	-
12	+	-	+	+
13	+	+	-	-
14	+	+	-	+
15	+	+	+	-
16	+	+	+	+

QUADRO 2 - PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴ PARA VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE QUATRO FATORES NA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E CAROTENOIDES

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Os níveis - e + indicam, respectivamente, os valores inferior e superior testados para cada fator avaliado.

II- Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.3 Cultivos para a verificação da formação de biomassa e carotenoides totais em função do tempo

Os cultivos para a realização das curvas de crescimento e formação de carotenoides totais foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido ATCC 876 em pH 7,6, aos quais foram adicionados 2,5 mL da suspensão da bactéria, a fim de obter a concentração inicial de células entre 0,1 e 0,2 de medida de densidade óptica a 540 nm. Os frascos foram mantidos na incubadora com agitação orbital Tecnal a 37°C e a 150 rpm. Como o experimento foi realizado em triplicata, a cada 12 horas, 3 cultivos eram retirados da incubadora e os controles de pH, concentração de células e de carotenoides totais eram realizados.

4.3 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS

Para a obtenção de células pigmentadas, estas foram separadas do meio de cultivo por centrifugação a 7000 rpm, durante 50 minutos, em centrífuga Janetzi, modelo T23. O sobrenadante foi descartado e as células presentes no precipitado foram lavadas com solução de cloreto de sódio a 25% (v/v), congeladas a -18°C e secas em liofilizador de bancada, marca Operon, até peso constante. As células secas foram utilizadas para a extração e identificação de carotenoides.

As células obtidas a partir dos frascos utilizados no planejamento fatorial e nas curvas de crescimento e formação de carotenoides totais foram separadas por centrifugação a 8500 rpm durante 15 minutos em centrífuga Sigma, modelo 3-16P. As células obtidas dos cultivos foram congeladas a -18°C e secas em liofilizador de bancada, marca Operon, até peso constante.

4.4 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES

Foram empregados diferentes sistemas de solventes para a extração dos carotenoides das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovorum*, com o objetivo de determinar o melhor procedimento para a obtenção do extrato seco de carotenoides.

Inicialmente, foi testada a adição de água destilada às células secas do micro-organismo para que ocorresse a ruptura dessas células e, conseqüentemente, para que o processo de extração por diferentes solventes - tais como: metanol seguido por éter de petróleo (YACHAI, 2009), acetona seguida por éter de petróleo (ASKER; OHTA, 1999) e 20% de acetona em metanol seguido por acetato de etila (STRAND; SHIVAJI; LIAAEN-JENSEN, 1997) - fosse facilitado. Dessa forma, 1 g de células secas, trituradas em gral com pistilo, foi colocado em um tubo de centrífuga e hidratado com 11,1 mL de água por 15 minutos à temperatura ambiente. Ao tubo de centrífuga foram adicionados 5 mL do primeiro solvente. A suspensão de células foi homogeneizada, permaneceu em contato com o solvente por uma hora e foi centrifugada a 7000 rpm, durante 15 minutos, em centrífuga Janetzi modelo T23. O sobrenadante obtido foi transferido para outro tubo de centrífuga, ao qual foi adicionado o segundo solvente. O tubo foi homogeneizado para que houvesse a migração dos carotenoides para o segundo solvente. Este foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com o mesmo solvente. O extrato foi evaporado no concentrador de amostras Centrivap, marca Labconco, a 35°C por tempo variável.

Alternativamente, a extração dos carotenoides foi realizada sem a adição prévia de água destilada e, portanto, somente com os solventes: metanol (FONG *et al.*, 2001), acetona (FANG *et al.*, 2010) ou acetato de etila seguido por metanol (MANDELLI *et al.*, 2012). Assim, após a trituração das células secas em um gral com pistilo, 1 g de células secas trituradas foi colocado em um tubo de centrífuga, ao qual foi adicionado 5 mL de solvente. A suspensão de células foi homogeneizada, permaneceu em contato com o solvente por uma hora e foi centrifugada a 7000 rpm, durante 15 minutos, em centrífuga Janetzi, modelo T23. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL. No sedimento, foi repetido o processo de extração, reunindo-se os sobrenadantes. O volume do balão foi

completado com o solvente utilizado na extração. O extrato foi seco no concentrador de amostras Centrivap, marca Labconco, a 35°C por tempo variável. Os extratos obtidos foram utilizados para a verificação do melhor sistema de solventes para a extração de carotenoides. O extrato seco obtido com acetona também foi utilizado para a obtenção do espectro de absorção na região do ultravioleta e visível, bem como para as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). O extrato seco obtido em metanol foi empregado na análise por cromatografia em camada delgada (CCD).

Após a verificação do solvente adequado para a extração dos carotenoides, foi realizada a extração das células obtidas dos cultivos do planejamento fatorial e das curvas de crescimento e formação de carotenoides totais. Para isso, ao tubo contendo as células secas, foi adicionado 1 mL de metanol. A suspensão de células foi homogeneizada, permaneceu em contato com o solvente por 30 minutos e foi centrifugada a 8500 rpm, durante 15 minutos, em centrífuga Sigma, modelo 3-16P. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon, de 50 mL de capacidade. No sedimento, foi repetido o processo de extração até que as células ficassem descoloridas, reunindo-se os sobrenadantes. O extrato foi seco no concentrador de amostras Centrivap, marca Labconco, a 35°C por tempo variável. O extrato seco foi ressuspenso em 2 mL de etanol para a determinação da concentração de carotenoides totais (item 4.5.5).

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Medida de valores de pH

Os valores de pH das amostras do cultivo foram determinados em potenciômetro de bancada MS Tecnopon, modelo mPA-210, à temperatura ambiente (entre 20°C e 25°C).

4.5.2 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular ou biomassa seca nas amostras do cultivo foi realizada pelo método gravimétrico, técnica do peso seco (ALTERTHUM, 2001).

Para isso, um volume de cultivo foi transferido para tubos de polipropileno de 5 mL de capacidade, previamente secos e pesados, centrifugado a 8500 rpm por 15 minutos, em centrífuga Sigma, modelo 3-16P. O sobrenadante foi descartado e as células obtidas foram congeladas a -18°C e secas em liofilizador de bancada, marca Lodan, até peso constante. Os tubos foram novamente pesados em balança analítica Bioprecisa, modelo FA-2104N.

A determinação da concentração de biomassa seca em g.L^{-1} foi realizada segundo Hiss (2001), utilizando a equação **(1)**:

$$C = \frac{X}{V} \quad (1)$$

onde: C = concentração de biomassa seca (g.L^{-1})

X = biomassa seca (g)

V = volume de cultivo (L)

4.5.3 Determinação da produtividade em biomassa

A produtividade em biomassa é uma medida da velocidade média de crescimento do micro-organismo em função do tempo de cultivo e foi calculada segundo Hiss (2001) pela equação **(2)**:

$$P_x = \frac{(X_t - X_0)}{t} \quad (2)$$

onde: P_x = produtividade em biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

X_t = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no tempo "t" de cultivo

X_0 = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no início do cultivo

t = tempo de cultivo (h)

4.5.4 Determinação do espectro de absorção nas regiões do ultravioleta e visível

O espectro de absorção dos carotenoides foi obtido no espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV1601PC, no intervalo de comprimento de onda de 300 a 600 nm, utilizando o extrato seco obtido em acetona (conforme a descrição no item 4.4) e solubilizado em metanol.

4.5.5 Determinação da concentração de carotenoides totais

A concentração de carotenoides totais nos extratos secos, obtidos conforme a descrição no item 4.4, e solubilizados em etanol foi calculada a partir da absorbância da solução etanólica, a qual foi determinada em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV1601PC, e de dados da literatura da absorvidade específica ($A_{1\text{ cm}}^{1\%}$) para os carotenoides a 450 nm (DAVIES, 1976).

Assim, considerando que $A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2500$, ou seja, que uma solução de concentração $1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresenta absorbância de 0,25, a concentração de carotenoides totais foi calculada pelas equações **(3)** a **(5)**:

$$C_1 = \frac{\text{Abs}}{0,25} \quad \text{(3)}$$

onde: C_1 = concentração de carotenoides totais no extrato etanólico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Abs = absorbância da amostra

$$C_2 = 2C_1 \quad (4)$$

onde: C_2 = concentração de carotenoides totais em 2 mL de extrato etanólico
($\mu\text{g} \cdot 2\text{mL}^{-1}$)

C_1 = concentração de carotenoides totais em 1 mL de extrato etanólico
($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

$$C_c = \frac{C_2}{m} \quad (5)$$

onde: C_c = concentração de carotenoides totais nas células secas (μg de carotenoides por grama de células secas)

C_2 = concentração de carotenoides totais em 2 mL de extrato etanólico
($\mu\text{g} \cdot 2\text{mL}^{-1}$)

m = biomassa seca (g)

4.5.6 Determinação da produtividade em carotenoides totais

A produtividade em carotenoides totais é uma medida da velocidade média de formação do produto em função do tempo de cultivo e foi calculada segundo Hiss (2001) pela equação **(6)**:

$$P_p = \frac{(P_t - P_0)}{t} \quad (6)$$

onde: P_p = produtividade em carotenoides totais ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

P_t = concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) no tempo "t" de cultivo

P_0 = concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) no início do cultivo

t = tempo de cultivo (h)

4.5.7 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

A avaliação qualitativa dos extratos em acetona e em metanol, obtidos conforme a descrição no item 4.4, foi realizada por cromatografia em camada delgada, utilizando cromatofolhas de sílica 60 F254 em suporte de alumínio como fase estacionária, 50% de acetona em hexano como fase móvel e β -caroteno como padrão, baseando-se na metodologia descrita por Fang *et al.* (2010). As bandas obtidas foram visualizadas nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e registradas por meio de fotografias.

4.5.8 Análise por cromatografia em fase líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

A análise qualitativa de carotenoides do extrato em acetona, obtido conforme a descrição no item 4.4, foi realizada por CLAE-EM, utilizando o cromatógrafo Agilent 1100, composto por bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1379A e gerenciador de amostras CTC Waters 2777, acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da Applied Biosystems, modelo API 3200, equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus e fontes de ionização *electrospray* (ESI) ou ionização química à pressão atmosférica (APCI), ambas no modo positivo. O extrato seco obtido da extração com acetona das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovorum* foi dissolvido em acetonitrila e diluído até uma concentração final de 500 ng.mL⁻¹.

Para o desenvolvimento da metodologia, foram utilizadas duas colunas de fase reversa, a X Bridge[®] C18 (2,1 x 150 mm, 5 μ m) e a Poroshell[®] 300 SB-C18 (2,1 x 75 mm, 5 μ m). Para a constituição da fase móvel, várias combinações de solventes grau CLAE foram testadas, usando acetonitrila, metanol, água e éter metil terc-butílico, contendo ou não o aditivo ácido fórmico 0,1% (v/v), em modo gradiente (QUADRO 3). Foram testados os fluxos de fase móvel de 250 μ L.min⁻¹ e 350 μ L.min⁻¹ e os volumes de injeção de amostra de 5 μ L e 20 μ L.

Fase móvel		Gradiente			
Eluente A	Eluente B				
água/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v)	acetonitrila/ ácido fórmico (99,9:0,1, v/v)	I 5% A de 0 a 7 min 5% A para 2% A em 7 min 2% A para 50% A em 7 min 50% a para 98% A em 5 min	II 95% A de 0 a 10 min 95% A para 70% A em 2 min 70% A por 2 min 70% A para 50% A em 2 min 50% A para 95% A em 2 min 95% A por 5 min	III 95% A de 0 a 3 min 95% A para 70% A em 1 min 70% A por 1 min 70% A para 50% A em 5 min 50% A para 95% A em 2 min 95% A por 5 min	
acetonitrila/metanol (85:15, v/v)	água/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v)	IV 5% A de 0 a 3 min 5% A para 30% A em 1 min 30% A por 1 min 30% A para 50% A em 5 min 50% A para 5% A em 2 min 5% A por 5 min	V 5% A de 0 a 1 min 5% A para 30% A em 0,1 min 30% A para 50% A em 9,9 min 50% A por 10 min 50% A para 5% A em 5 min 95% A por 2 min	VI 30% A para 70% A em 40 min	VII 5% A de 0 a 1 min 5% A para 30% A em 0,1 min 30% A para 50% A em 9,9 min 50% A por 10 min 50% A para 5% A em 5 min 95% A por 5 min
metanol/éter metil terc-butílico/água (81:15:4, v/v/v)	metanol/éter metil terc- butílico/água (4:92:4, v/v/v)	VIII 100% A para 70% A em 22 min 70% A para 48,7% A em 10 min 48,7% A para 37,3% A em 23 min 37,3% A para 0% em 5 min 0% A por 5 min 0% A para 100% A em 5 min	IX 0% A para 30% A em 22 min 30% A para 51,3% A em 10 min 51,3% A para 62,7% A em 23 min 62,7% A para 100% A em 5 min 100% A por 5 m in 100% A para 0% A em 5 min	X 100% A por 2 min 100% A para 90% A em 10 min 90% A por 2 min	
acetonitrila/metanol (85:15, v/v)	metanol/éter metil terc- butílico/água (4:92:4, v/v/v)	VIII			
metanol/água (50:50, v/v)	metanol/éter metil terc- butílico/água (4:92:4, v/v/v)	VIII			
metanol/água (85:15, v/v)	metanol/éter metil terc- butílico/água (4:92:4, v/v/v)	XI 100% A por 2 min 100% A para 70% A em 20 min 70% A para 48,7% A em 10 min 48,7% A para 37,3% A em 23 min 37,3% A para 0% em 5 min 0% A por 5 min 0% A para 100% A em 5 min			

QUADRO 3 - COMBINAÇÕES DE SOLVENTES E GRADIENTES UTILIZADOS PARA A CONSTITUIÇÃO DE FASE MÓVEL NA ORDEM EM QUE FORAM TESTADOS

FONTE: O autor (2012)

NOTA: A primeira combinação de solventes contendo água, ácido fórmico e acetonitrila, assim como o gradiente I foram modificados a partir do trabalho de Prasain *et al.* (2005). Foram realizadas alterações nos gradientes e na combinação de solventes para melhorar a separação e identificação dos componentes da amostra. Como a melhora não foi obtida, a combinação de solventes contendo metanol, éter metil terc-butílico e água, bem como o gradiente VIII foram testados de acordo com a metodologia descrita por Schweiggert *et al.* (2005). Alterações no gradiente e na combinação de solventes foram empregadas até que a separação dos componentes da amostra e a sua identificação fossem obtidas com boa resolução.

4.5.9 Análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

A análise qualitativa do extrato seco obtido em acetona, conforme a descrição no item 4.4, foi realizada por RMN de ^1H , utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 T e observando o núcleo de ^1H a 400,13 MHz. Para isso, 1,5 mg do extrato seco foi dissolvido em uma alíquota de 0,6 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) contendo 0,05% de tetrametilsilano (TMS). Essa solução foi filtrada e diretamente transferida para um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro.

Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao sinal do padrão interno TMS a 0,00 ppm. O sinal central do solvente clorofórmio deuterado foi observado em 2,27 ppm.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise dos resultados do planejamento fatorial foi realizada usando o *software* Minitab 7.0. As análises de normalidade foram realizadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e as análises de homogeneidade de variâncias, pelo teste de Levene. Os experimentos foram realizados em triplicata. Um valor de probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$) foi considerado significativo em todos os testes. Foram excluídos um valor de concentração de biomassa (uma das replicatas do ensaio 13, cujo valor foi de $2,58 \text{ g.L}^{-1}$) e dois valores de concentração de carotenoides totais (duas replicatas do ensaio 11, cujos valores foram 89,52 e 181,69 μg de carotenoides por grama de células secas), os quais foram detectados como *outliers* pelo método de Análise de Variância (ANOVA). Também foram excluídas interações de segunda e terceira ordem consideradas estatisticamente não significativas. O valor de R^2 foi calculado para os modelos criados para a concentração de células e de carotenoides totais; este valor, quando multiplicado por 100, representa a porcentagem da variabilidade que foi contabilizada com as variáveis especificadas

pelo modelo. Assim, um valor de R^2 próximo de 1,00 indica que quase toda a variabilidade foi contabilizada.

As comparações múltiplas das médias obtidas para as combinações possíveis dos níveis dos fatores no planejamento fatorial foram realizadas pelo método de Tukey, ajustado para que o nível de confiança simultâneo fosse de 95%. Os intervalos de confiança para cada uma das médias resultantes das combinações de níveis dos fatores foram construídos usando o nível de significância de 5% e o desvio padrão correspondente de cada amostra ($n=3$), adotando a distribuição de probabilidade t de Student.

Os valores de concentração de biomassa e de carotenoides totais das curvas de crescimento e de formação de carotenoides totais foram expressos como média \pm desvio padrão. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

As extrações de carotenoides realizadas com a hidratação prévia das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovororum*, usando água destilada, não forneceram resultados satisfatórios. Em contato com a água, as células formaram uma gelatina, que impediu a migração dos carotenoides para a fase orgânica quando o solvente orgânico foi adicionado. Como o solvente orgânico permaneceu incolor, a determinação de carotenoides totais não foi realizada.

Entre as extrações apenas com solventes orgânicos, a extração com metanol foi considerada a mais eficiente, uma vez que as células ficaram despigmentadas após duas extrações consecutivas, o que evidenciou que todo o pigmento das células foi transferido para o solvente. A extração com acetona foi menos eficiente, já que a acetona não foi capaz de extrair todo o pigmento das células, pois estas, após várias extrações sucessivas, permaneceram com coloração avermelhada. Já a extração com acetato de etila seguido por metanol não foi reprodutível, visto que em algumas situações as células ficaram despigmentadas após duas extrações consecutivas, enquanto em outras situações, as células ainda permaneceram pigmentadas após duas extrações.

A eficiência das extrações foi comparada visualmente pela intensidade da coloração dos extratos obtidos. O extrato em metanol forneceu a coloração mais intensa, e a determinação da concentração de carotenoides totais nesse extrato foi de cerca de 50 µg por grama de células secas.

5.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O extrato seco, proveniente da extração com acetona das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovororum*, foi analisado por CCD, a qual evidenciou a existência de pelo menos 5 substâncias diferentes, quatro delas mais polares que o

padrão de β -caroteno. A banda 2, que apresentou coloração alaranjada e $R_f = 0,68$, refere-se provavelmente aos carotenoides (FIGURA 5).

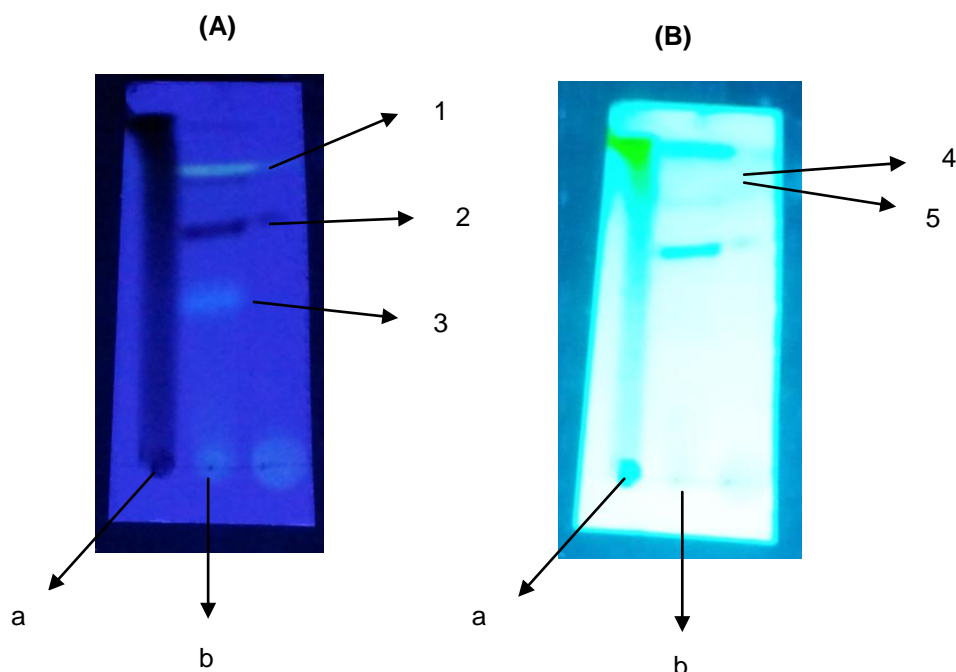


FIGURA 5 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO EM ACETONA MOSTRANDO AS BANDAS 1, 2 E 3 VISUALIZADAS NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 254 nm (A) E AS BANDAS 4 E 5 VISUALIZADAS NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 365 nm (B)

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Condições da cromatografia: fase estacionária caracterizada por cromatofolhas de sílica 60 F254 em suporte de alumínio e fase móvel composta por 50% de acetona em hexano.

II- "a" indica o local da aplicação do padrão de β -caroteno e "b" indica o local de aplicação do extrato seco obtido a partir da extração com acetona das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovorum*.

III- A banda 2 refere-se provavelmente aos carotenoides e sua composição será identificada posteriormente, assim como a composição das outras bandas.

Já a análise do extrato seco obtido por meio da extração com metanol das células secas da bactéria demonstrou a presença de pelo menos 3 substâncias. Nesse caso, a banda 2, que também apresentou coloração alaranjada e $R_f = 0,61$, possivelmente é referente aos carotenoides (FIGURA 6).

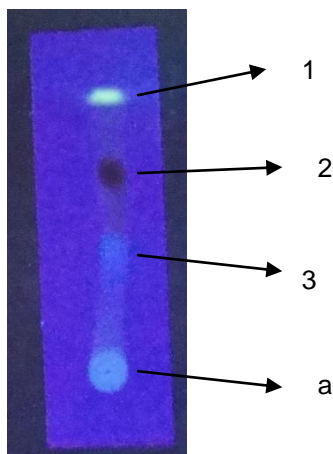


FIGURA 6 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DO EXTRATO EM METANOL MOSTRANDO AS BANDAS 1, 2 E 3 VISUALIZADAS NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 254 nm

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Condições da cromatografia: fase estacionária caracterizada por cromatofolhas de sílica 60 F254, em suporte de alumínio e fase móvel composta por 50% de acetona em hexano.

II- "a" indica o local de aplicação do extrato seco obtido por meio da extração com metanol das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovororum*.

III- A banda 2 refere-se provavelmente aos carotenoides e sua composição será identificada posteriormente, assim como a composição das outras bandas.

As análises por cromatografia em camada delgada mostraram que, provavelmente, a acetona é capaz de extrair uma diversidade maior de substâncias quando comparada ao metanol, visto que a quantidade de bandas na cromatografia utilizando o primeiro solvente foi maior. Apesar disso, ao contrário do metanol, a acetona é incapaz de extrair todo o pigmento das células, pois estas permaneceram coradas após pelo menos duas extrações consecutivas.

A composição das bandas visualizadas nas análises por CCD será avaliada posteriormente.

5.3 ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

O espectro de absorção do extrato seco das células da bactéria *Halorubrum saccharovororum*, obtido em acetona e solubilizado em metanol (FIGURA 7), confirmou a presença de pigmentos carotenoides, uma vez que no espectro foram verificadas três bandas na região do visível e com a forma característica atribuída a esses pigmentos (BRITTON, 1995b).

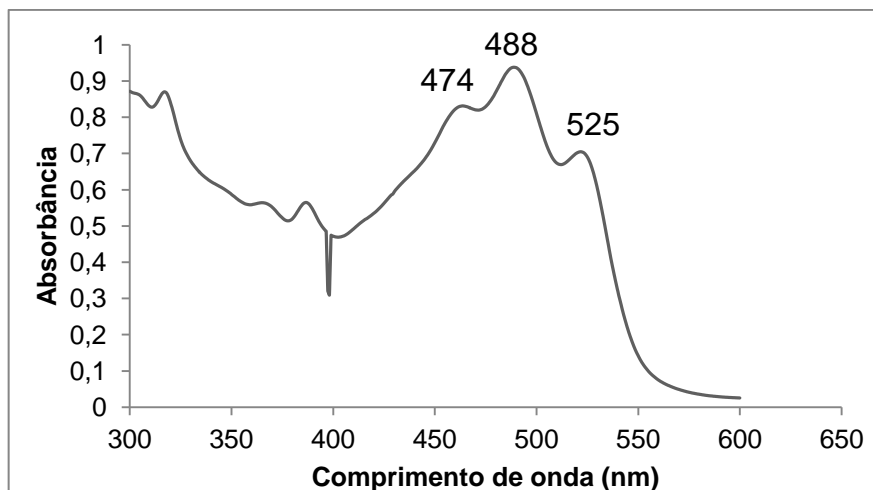


FIGURA 7 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO EXTRATO EM ACETONA DAS CÉLULAS SECAS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum*

FONTE: O autor (2012)

NOTA: O extrato seco obtido em acetona foi solubilizado em metanol para a obtenção do espectro de absorção no intervalo de comprimento de onda de 300 a 600 nm.

O espectro obtido mostrou um pico com absorção máxima no comprimento de onda de 488 nm e outros dois picos com absorções nos comprimentos de onda de 474 nm e 525 nm.

Mandelli *et al.* (2012) obtiveram o espectro de absorção do extrato em metanol de micro-organismos halofílicos do domínio *Archaea* e verificaram que o comprimento de onda máximo de absorção foi de 486 ± 2 nm. Além disso, analisaram a composição em carotenoides desse extrato e observaram a presença da bacterioruberina, seus derivados e isômeros.

Asker e Ohta (1999) determinaram o espectro de absorção do extrato em hexano das células de bactérias halofílicas e encontraram picos de absorção máximos nos comprimentos de onda de 493 e 527 nm, além de um largo ombro em 467 nm, indicando que o principal carotenoide presente era a bacterioruberina.

Desse modo, como os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes àqueles mostrados pelos autores supracitados, é possível afirmar que a bactéria *Halorubrum saccharovorum* pode apresentar carotenoides como a bacterioruberina em sua composição.

5.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HIFENADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM)

O extrato em acetona das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovorum* foi utilizado nas análises por CLAE-EM porque apresentou maior diversidade de substâncias na análise por CCD que o extrato em metanol. Por isso, naquele extrato seria mais provável a identificação preliminar de maior número de substâncias.

A amostra na concentração de 500 ng.mL^{-1} foi analisada, primeiramente, por injeção direta no espectrômetro de massas, utilizando a ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo para a verificação da potencialidade da bactéria para a formação de carotenoides. O modo positivo de ionização foi selecionado por duas razões: a maioria dos trabalhos existentes na literatura sobre a identificação de carotenoides utilizou esse modo de ionização e o carotenoide característico das bactérias halofílicas, do domínio *Archaea*, a bacterioruberina, apresenta átomos de oxigênio em sua molécula, os quais podem ser protonados (RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012). Foram evidenciados os íons de m/z na região de 700 a 1000 Da, característicos do pigmento carotenoide bacterioruberina e seus derivados monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina e trisanidrobacterioruberina (KELLY; NORGARD; LIAAEN-JENSEN, 1970; KUSHWAHA; KRAMER; KATES, 1975; RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1995; STRAND; SHIVAJI; LIAAEN-JENSEN, 1997; FONG *et al.*, 2001; ASKER; AWAD; OHTA, 2002; MANDELLI *et al.*, 2012).

Uma vez evidenciada a presença desses íons, foi realizado o acoplamento da cromatografia em fase líquida de alta eficiência à espectrometria de massas, para que os componentes da amostra de concentração de $37,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ fossem separados e os carotenoides presentes fossem identificados. Para isso, diferentes parâmetros no espectrômetro de massas e diversas condições cromatográficas foram variados para a obtenção da melhor separação dos carotenoides.

As análises por CLAE-EM, realizadas com a coluna X Bridge[®] e com ionização por ESI no modo positivo, iniciaram com a fase móvel composta por água e acetonitrila, contendo ácido fórmico a 0,1% (v/v) em um fluxo de $250 \text{ } \mu\text{L.min}^{-1}$; foi utilizado o gradiente I descrito no quadro 3 (PRASAIN *et al.*, 2005). Primeiramente, foi realizada a injeção de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra na concentração de $37,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, mas

como os íons característicos de carotenoides não foram verificados nos espectros de massas, o volume de injeção foi aumentado para 20 μL , o que não modificou os resultados. Portanto, foi feita outra análise nas mesmas condições, utilizando, entretanto, o gradiente II (QUADRO 3), o que não alterou significativamente os resultados anteriormente obtidos. Por isso, a concentração da amostra foi aumentada para $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, mantendo o volume de injeção, retornando ao gradiente I (QUADRO 3) e, em seguida, testando o gradiente III (QUADRO 3). Nessas condições, apesar de os picos nos cromatogramas não apresentarem boa resolução, os íons característicos de carotenoides foram identificados, mesmo apresentando baixa intensidade. Dessa forma, o metanol foi incluído na composição da fase móvel, usando o gradiente IV (QUADRO 3) e, em seguida, o gradiente V (QUADRO 3) com o intuito de obter uma melhor resolução e, conseqüentemente, uma maior intensidade dos picos. Mesmo assim, não foram obtidos resultados satisfatórios. Por isso, foi testada outra coluna, a Poroshell[®], nas mesmas condições da última análise. Todavia, o cromatograma apresentou resolução ainda pior que a obtida com a coluna X Bridge[®].

Diante disso, a coluna X Bridge[®] voltou a ser utilizada nas mesmas condições, mas com o gradiente VI (QUADRO 3). Logo em seguida, foi empregado o gradiente VII (QUADRO 3), aumentando-se o fluxo de fase móvel para $350 \mu\text{L.min}^{-1}$. Contudo, essas análises não apresentaram resultados diferentes dos já citados.

Desse modo, foi realizado um teste com a fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) no modo positivo. O teste foi realizado nas mesmas condições da análise anterior. A figura 8 mostra o cromatograma obtido, cujos picos apresentaram uma melhor resolução. Os espectros de massas extraídos desse cromatograma (dados não mostrados) demonstraram que a ionização por APCI foi melhor que a ionização por ESI, visto que forneceu uma melhor ionização dos componentes da amostra.

Mantendo as mesmas condições da análise anterior, nova análise foi realizada com a alteração da composição da fase móvel para metanol, éter metil terc-butílico e água, utilizando o gradiente VIII descrito no quadro 3 (SCHWEIGGERT *et al.*, 2005). Todos os picos do cromatograma foram verificados em até 13 minutos de análise. Os espectros de massas extraídos do cromatograma evidenciaram a presença de íons de m/z 741, 723 e 705 $[\text{M}+\text{H}]^+$, característicos da

bacterioruberina e seus derivados. No entanto, os picos do cromatograma não apresentaram boa resolução. Por isso, foi utilizado o gradiente IX (QUADRO 3), com o qual todos os picos do cromatograma foram verificados em até 5 minutos de análise com baixa resolução entre eles. O gradiente de fase móvel foi novamente modificado, sendo utilizado então o gradiente X (QUADRO 3). Entretanto, a resolução do cromatograma não melhorou. Assim, foi alterada novamente a composição da fase móvel com a inclusão da acetonitrila, utilizando o gradiente VIII, porém não houve mudança significativa no cromatograma obtido.

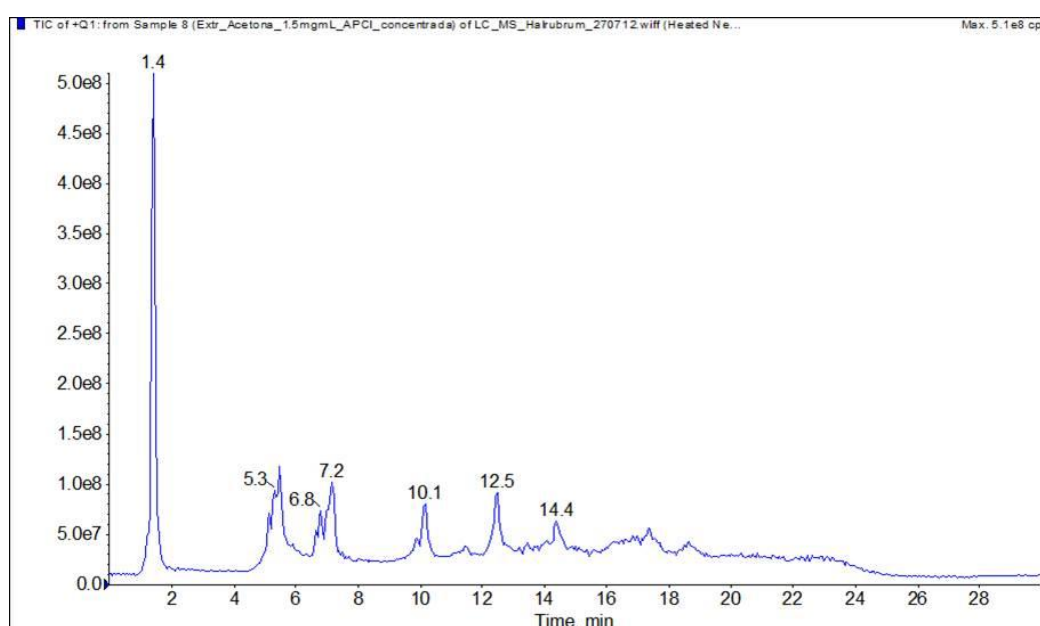


FIGURA 8 - CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE POR CLAE-APCI-EM DO EXTRATO EM ACETONA DAS CÉLULAS SECAS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovororum*, UTILIZANDO O GRADIENTE VII

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Condições da cromatografia: coluna de fase reversa X Bridge® C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), volume de injeção de amostra de 20 µL, fase móvel composta por acetonitrila/metanol (85:15, v/v; eluente A) e água/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v; eluente B), eluição gradiente (5% A de 0 a 1 minuto, 5% A para 30% A em 0,1 minuto, 30% A para 50% A em 9,9 minutos, 50% A por 10 minutos, 50% A para 5% A em 5 minutos, 95% A por 5 minutos), fluxo de fase móvel de 350 µL.min⁻¹, ionização APCI no modo positivo.

Uma nova alteração da composição da fase móvel foi realizada, empregando metanol/água (85:15, v/v) e metanol/éter metil terc-butílico/água (4:92:4; v/v/v) e o gradiente XI (QUADRO 3). Todos os picos do cromatograma foram verificados em até 40 minutos de análise e foi observada uma separação dos picos com boa resolução (FIGURA 9).

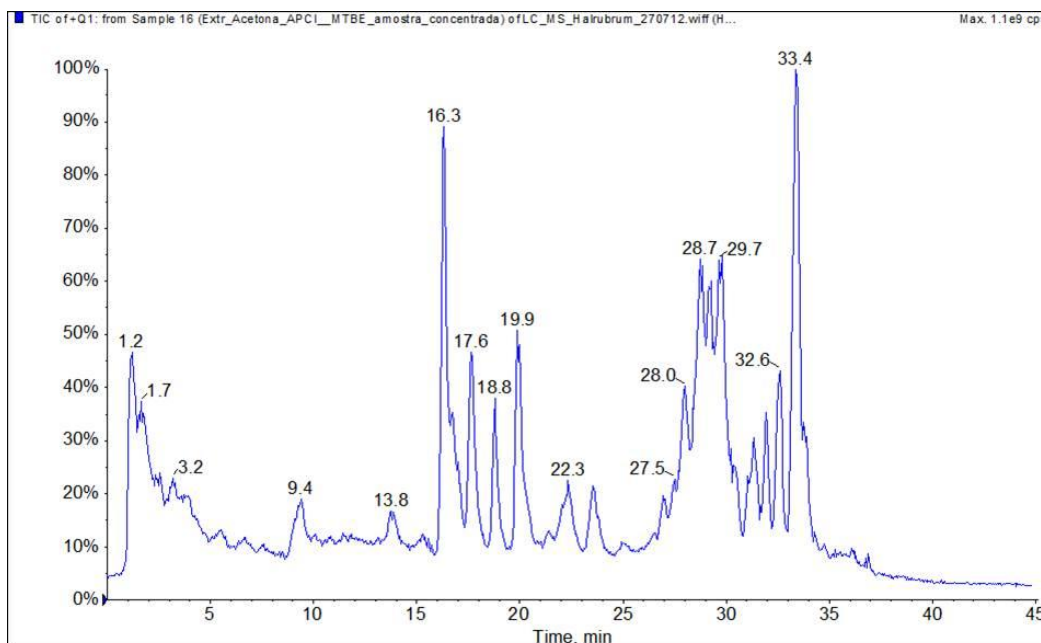


FIGURA 9 - CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS ANÁLISE POR CLAE-APCI-EM DO EXTRATO EM ACETONA DAS CÉLULAS SECAS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum*, UTILIZANDO O GRADIENTE XI.

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Condições da cromatografia: coluna de fase reversa X Bridge[®] C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), volume de injeção de amostra de 20 µL, fase móvel composta por metanol/água (85:15, v/v; eluente A) e metanol/éter metil terc-butílico/água (4:92:4, v/v/v; eluente B), eluição gradiente (100% A por 2 minutos, 100% A para 70% A em 20 minutos, 70% A para 48,7% A em 10 minutos, 48,7% A para 37,3% A em 23 minutos, 37,3% A para 0% A em 5 minutos, 0% A por 5 minutos e 0% A para 100% A em 5 minutos), fluxo de fase móvel de 350 µL.min⁻¹, ionização APCI no modo positivo.

Dessa forma, a metodologia estabelecida para a análise da amostra compreende a utilização da coluna de fase reversa X Bridge[®] C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm), com um volume de injeção de amostra de 20 µL, fase móvel composta por metanol/água (85:15, v/v; eluente A) e metanol/éter metil terc-butílico/água (4:92:4, v/v/v; eluente B), eluição gradiente (100% A por 2 minutos, 100% A para 70% A em 20 minutos, 70% A para 48,7% A em 10 minutos, 48,7% A para 37,3% A em 23 minutos, 37,3% A para 0% A em 5 minutos, 0% A por 5 minutos e 0% A para 100% A em 5 minutos), fluxo de fase móvel de 350 µL.min⁻¹ e ionização por APCI no modo positivo com os seguintes parâmetros ajustados no espectrômetro de massas: *curtain gas* (CUR) de 10 psi, *needle current* (NC) de 4 µA, *temperature* (TEM) de 400°C e *ion source gas 1* (GS1) de 40 psi.

Diversos espectros de massas foram extraídos por meio do cromatograma mostrado na figura 9. Nos espectros extraídos dos tempos de retenção de 16,3

minutos, 17,6 minutos, 18,8 minutos e 19,9 minutos foram verificados os íons de m/z 741, 723, 705 e 687 $[M+H]^+$ (FIGURAS 10 a 13). O íon de m/z 741 $[M+H]^+$ é referente ao íon molecular da bacterioruberina, enquanto os outros íons de m/z 723, 705 e 687 $[M+H]^+$ representam, respectivamente, os íons dos derivados da bacterioruberina que perderam uma, duas e três moléculas de água: a monoanidrobacterioruberina, a bisanidrobacterioruberina e a trisanidrobacterioruberina. Como a intensidade dos quatro íons foi diferente nos quatro tempos de retenção, cada um desses tempos pode ser atribuído à bacterioruberina e seus isômeros *cis-trans* (5-*cis*-bacterioruberina, 9-*cis*-bacterioruberina, 13-*cis*-bacterioruberina, 15-*cis*-bacterioruberina e 5-*cis*,9'-*cis*-bacterioruberina).

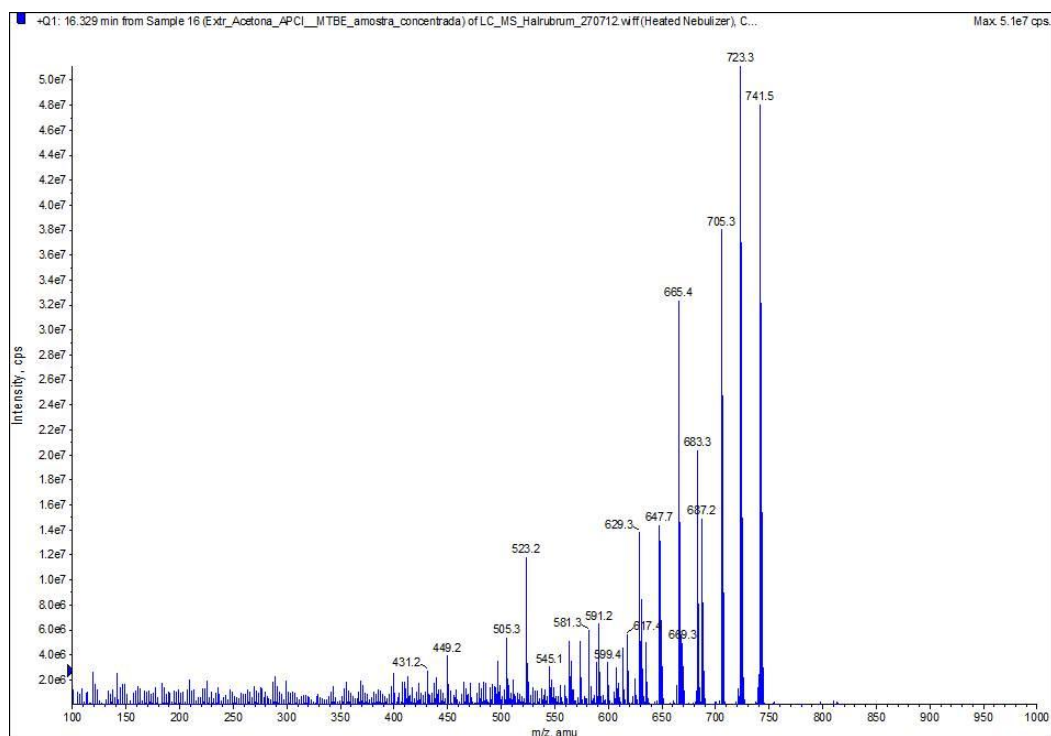


FIGURA 10 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 16,3 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
FONTE: O autor (2012)

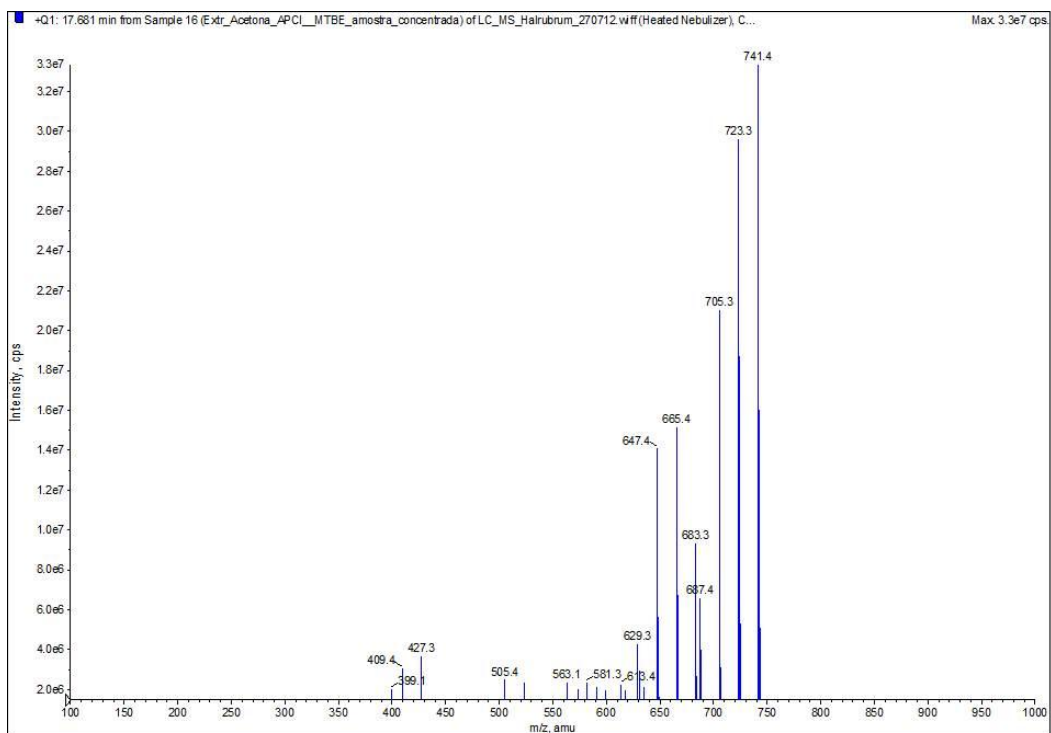


FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 17,6 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
FONTE: O autor (2012)

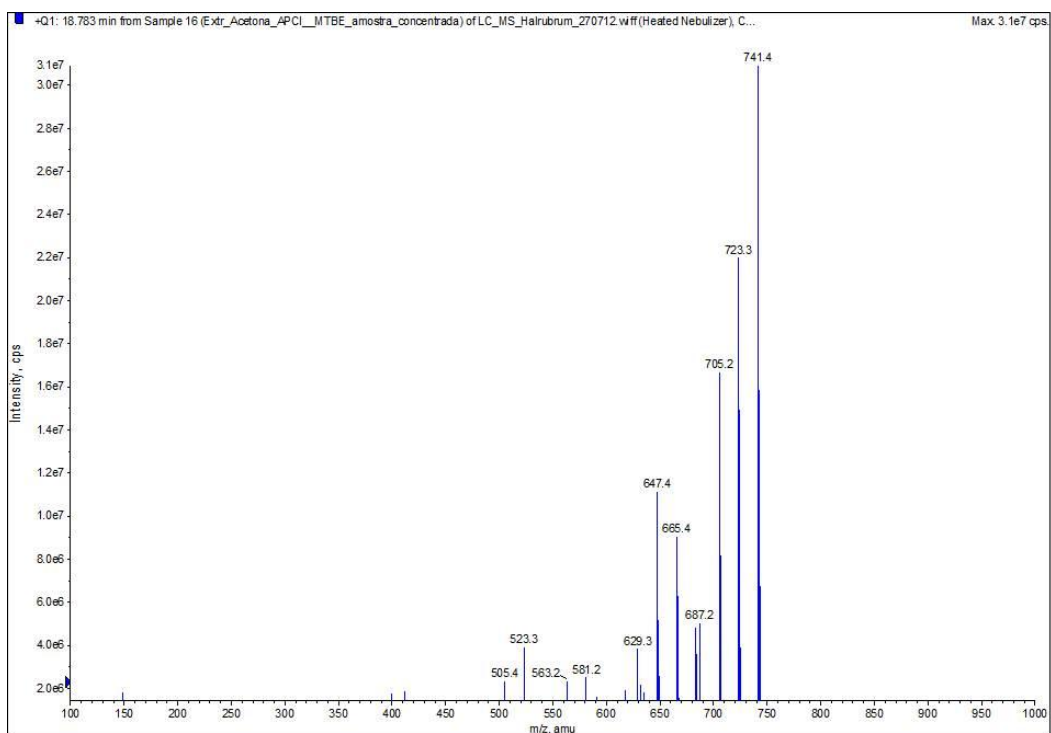


FIGURA 12 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 18,8 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
FONTE: O autor (2012)

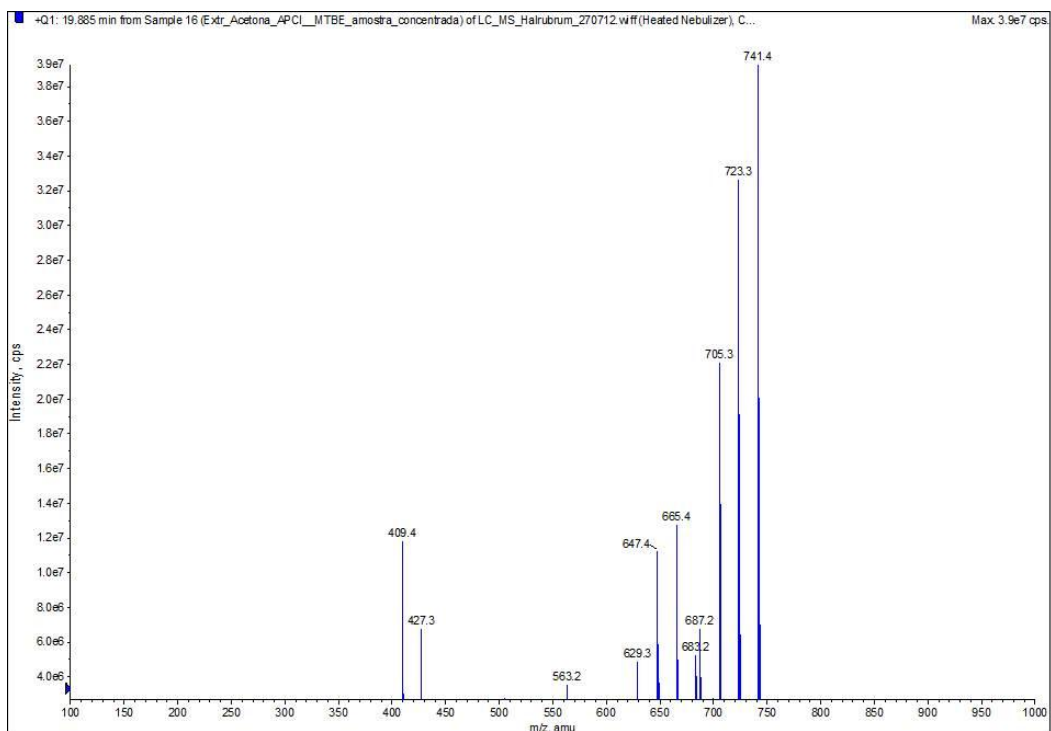


FIGURA 13 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 19,9 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
 FONTE: O autor (2012)

Para a confirmação dessas substâncias, análises por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos hifenada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) deverão ser realizadas. Isso porque a obtenção dos espectros de absorção dos componentes do extrato na região do ultravioleta e visível pode auxiliar na identificação de isômeros *cis-trans* (BRITTON, 1995b; MANDELLI *et al.*, 2012). Além disso, análises de RMN 1D e 2D, análises de amostras purificadas do extrato em acetona das células secas da bactéria e análises do extrato em metanol destas células também deverão ser realizadas.

Outros íons possivelmente referentes a compostos isoprenoides e/ou carotenoides comumente encontrados em bactérias halofílicas, do domínio *Archaea*, foram identificados nos espectros de massas extraídos, a partir do cromatograma mostrado na figura 9.

Desse modo, o espectro de massas, extraído no tempo de retenção de 22,3 minutos e mostrado na figura 14, evidenciou um íon de m/z 409 $[M+H]^+$, o qual pode ser indicativo da existência de dehidroesqualeno na amostra (KUSHWAHA *et al.*,

1972). Outros íons, apresentando m/z 411 $[M+H]^+$ no espectro extraído no tempo de retenção de 28,8 minutos (FIGURA 15) e m/z 413 $[M+H]^+$ no espectro extraído no tempo de retenção de 29,2 minutos (FIGURA 16), podem ser referentes ao esqualeno e ao di-hidroesqualeno, respectivamente (KRAMER; KUSHWAHA; KATES, 1972; KUSHWAHA; KRAMER; KATES, 1975; KUSHWAHA *et al.*, 1982). Os esqualenos são hidrocarbonetos isoprenoides que contêm 30 átomos de carbono e podem fazer parte da membrana celular do micro-organismo auxiliando na estabilidade dessa membrana (TORNABENE *et al.*, 1969; KRAMER; KUSHWAHA; KATES, 1972).

No tempo de retenção de 28,8 minutos, o espectro de massas extraído (FIGURA 15) mostrou ainda um íon de m/z 547 $[M+H]^+$, o qual pode ser indicativo da presença de licoperseno no extrato em acetona da bactéria *Halorubrum saccharovorum* (KUSHWAHA; KATES, 1973). O licoperseno é um carotenoide com 40 átomos de carbono e pode ser um precursor na síntese de carotenoides com 50 átomos de carbono, como a bacterioruberina (KUSHWAHA; KATES, 1973; KATES, 1977).

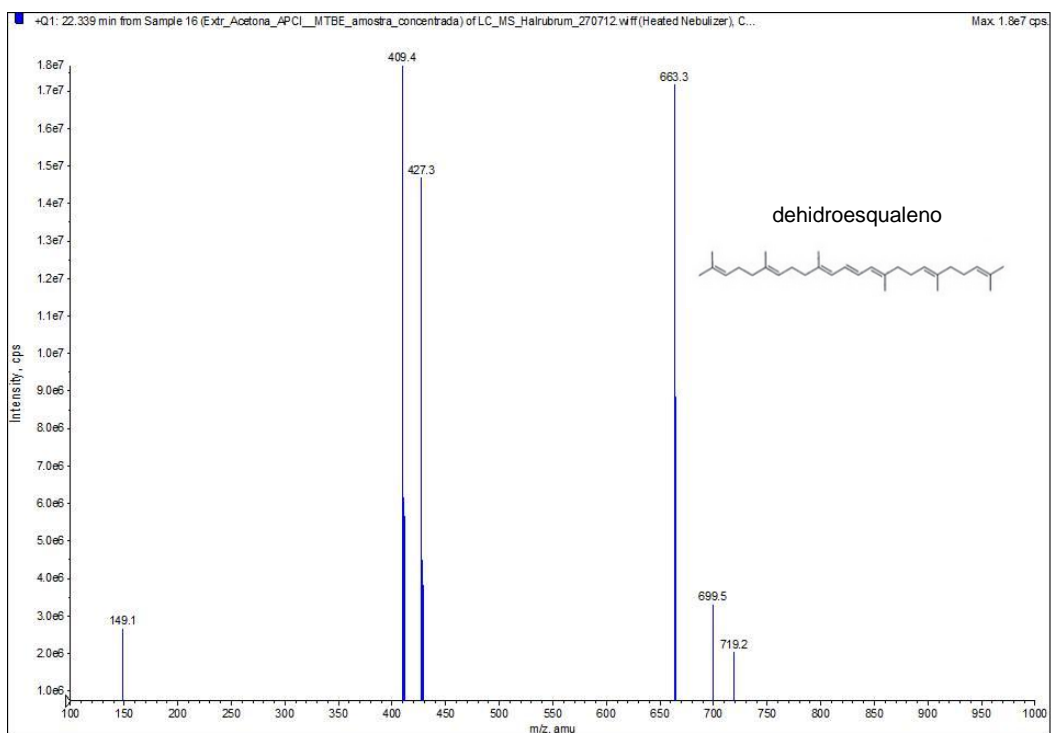


FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 22,3 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
 FONTE: O autor (2012)

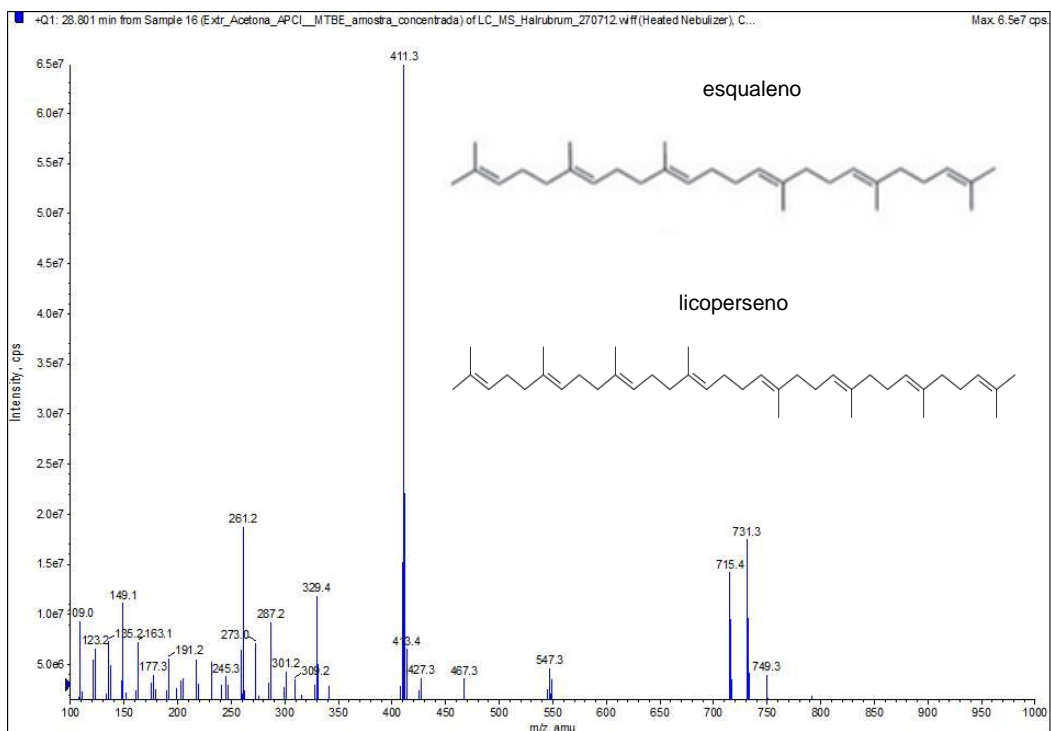


FIGURA 15 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 28,8 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
 FONTE: O autor (2012)

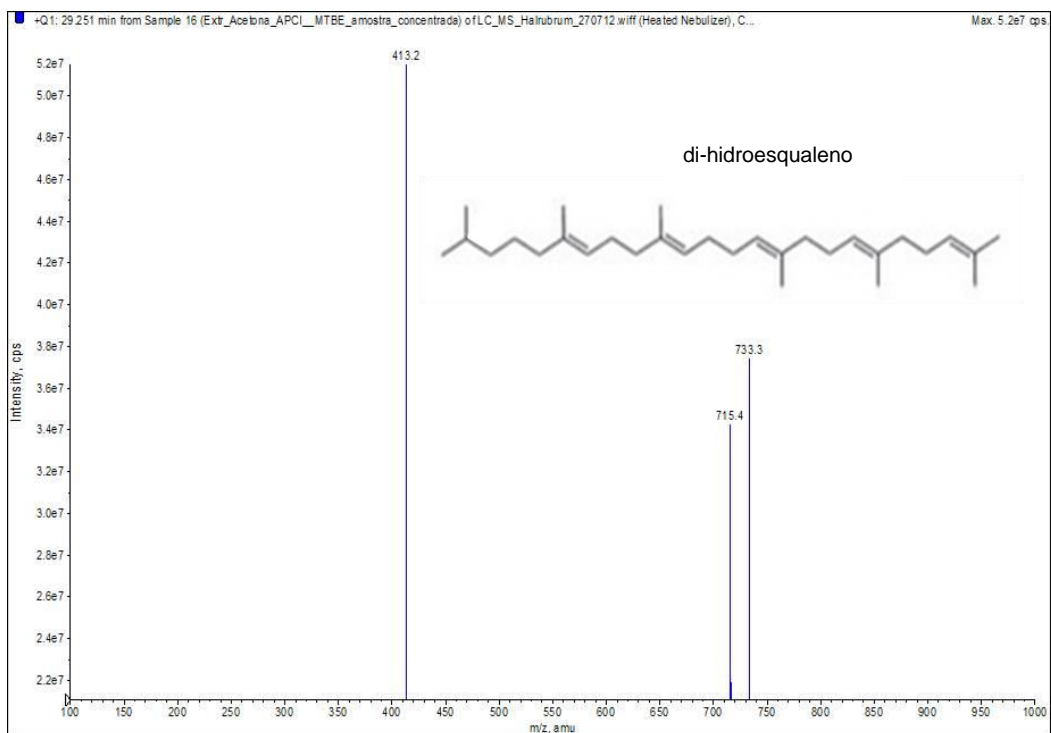


FIGURA 16 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 29,2 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
 FONTE: O autor (2012)

O fitoeno, um carotenoide composto por 40 átomos de carbono e que pode ser precursor de carotenoides com 50 átomos de carbono, possivelmente está presente no extrato em acetona das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovorum*, visto que no espectro de massas extraído no tempo de retenção de 27,5 minutos (FIGURA 17) foi evidenciado um íon de m/z 545 $[M+H]^+$ (KUSHWAHA *et al.*, 1972; KUSHWAHA; KRAMER; KATES, 1975; KATES, 1977; RIVERA; VILARÓ; CANELA, 2011).

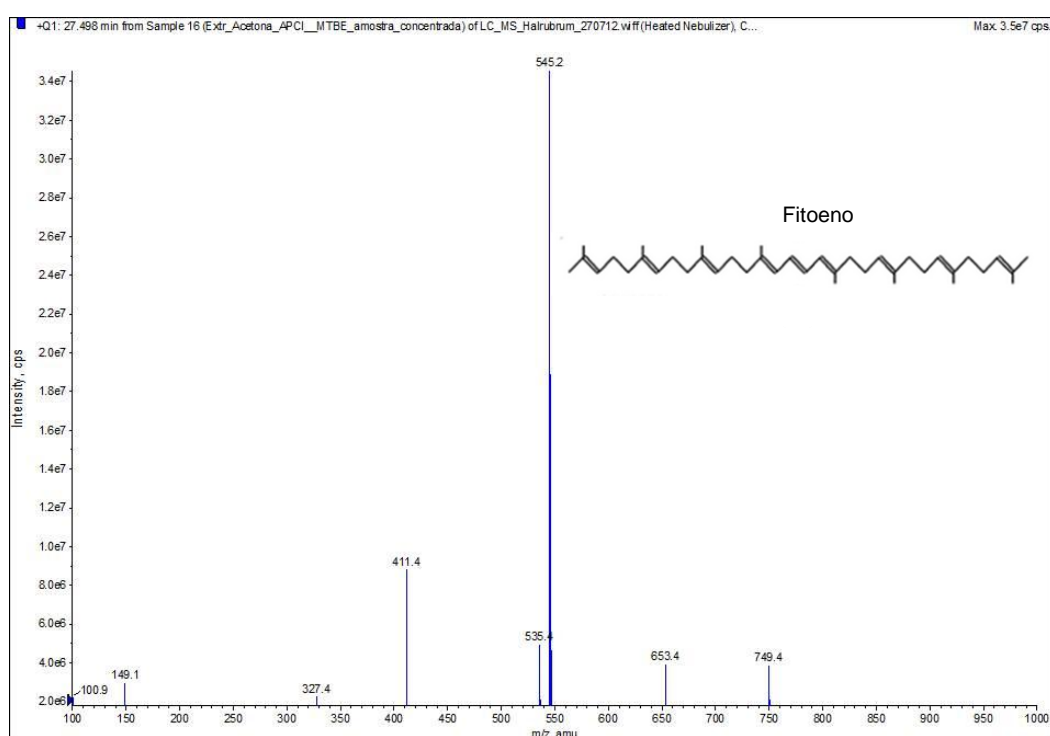


FIGURA 17 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 27,5 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
 FONTE: O autor (2012)

No espectro de massas extraído no tempo de retenção de 31,9 minutos (FIGURA 18), foi verificado um íon de m/z 717 $[M+H]^+$, o qual pode ser indicativo da presença de vitamina MK-8 ou menaquinona-8 no extrato em acetona das células da bactéria (KUSHWAHA; KRAMER; KATES, 1975; KUSHWAHA *et al.*, 1982; ASKER; AWAD; OHTA, 2002). A vitamina MK-8 é uma quinona que pode estar envolvida em sistemas de transporte de elétrons em micro-organismos aeróbios como o *Halorubrum saccharovorum* (TORNABENE *et al.*, 1969).

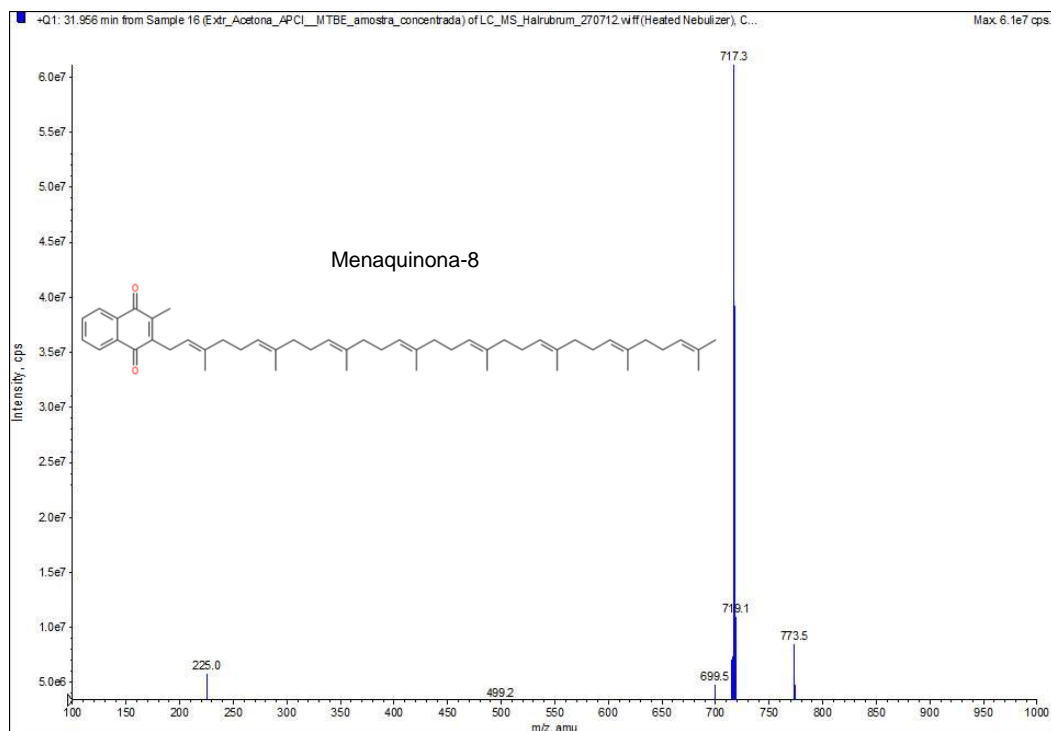


FIGURA 18 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 31,9 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
 FONTE: O autor

No tempo de retenção de 33,4 minutos (FIGURA 19), o espectro de massas extraído mostrou o íon de m/z 621 $[M+H]^+$, possivelmente referente à molécula de isopentenil desidrorodopina e ao íon de m/z 567 $[M+H]^+$, o qual pode ser relativo à 3-hidroxi-equinenona (RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1995; ASKER; AWAD; OHTA, 2002; RIVERA; VILARÓ; CANELA, 2011). A isopentenil desidrorodopina é um carotenoide que apresenta 45 átomos de carbono, enquanto a 3-hidroxi-equinenona é um cetocarotenoide, que contém 40 átomos de carbono (CALO *et al.*, 1995; RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1995)

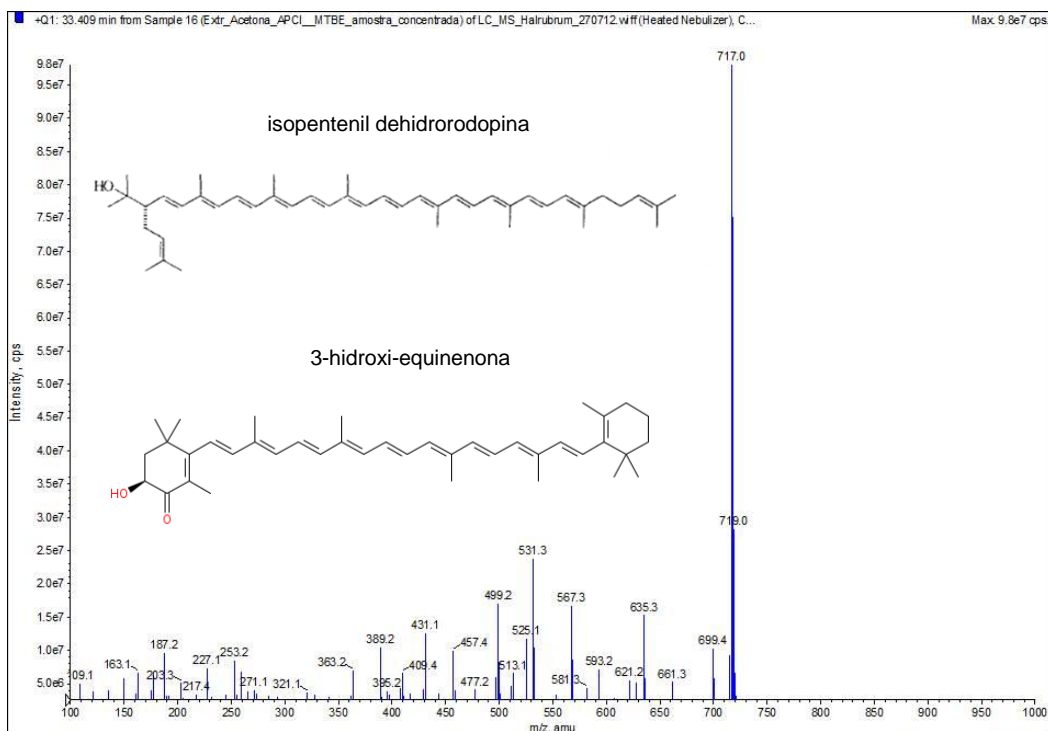


FIGURA 19 - ESPECTRO DE MASSAS EXTRAÍDO NO TEMPO DE RETENÇÃO DE 33,4 MINUTOS UTILIZANDO IONIZAÇÃO POR APCI NO MODO POSITIVO
 FONTE: O autor (2012)

5.5 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE ^1H)

O espectro de RMN de ^1H , obtido por meio da análise do extrato em acetona das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovorum* (FIGURA 20), evidenciou a presença dos deslocamentos químicos na região de 5,4 a 6,8 ppm e das constantes de acoplamento $J_{1',2''} = 9,1$ Hz e $12,9$ Hz, $J_{2,3} = 9,1$ Hz, $J_{3,4} = 15,6$ Hz, $J_{6,7} = 11,5$ Hz, $J_{7,8} = 14,9$ Hz, $J_{10,11} = 11,1$ Hz, $J_{11,12} = 14,9$ Hz, $J_{14,15} = 10,4$ Hz, característicos do esqueleto isoprenoide da bacterioruberina (KUSHWAHA; KRAMER; KATES, 1975; RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1992; RØNNEKLEIV *et al.*, 1995; RØNNEKLEIV; SYNNØVE, 1995; STRAND; SHIVAJI; LIAAEN-JENSEN, 1997).

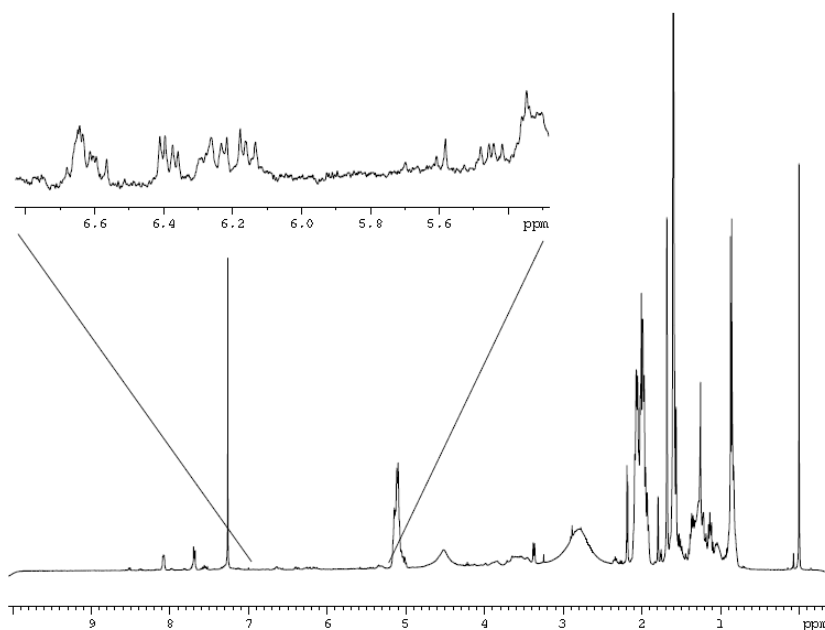


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H OBTIDO A PARTIR DA AMOSTRA SOLUBILIZADA EM CDCl_3 E PROVENIENTE DO EXTRATO SECO DAS CÉLULAS DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovororum*
 FONTE: O autor (2012)

A figura 21 mostra os valores dos deslocamentos químicos na região de 5,4 a 6,8 ppm, referentes aos hidrogênios do esqueleto isoprenoide da molécula de bacterioruberina, e que foram identificados no espectro mostrado na figura 20.

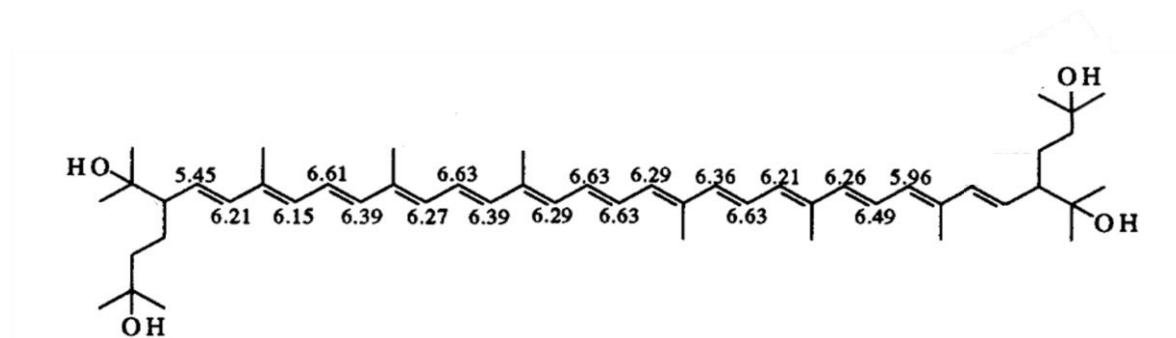


FIGURA 21 - ESTRUTURA DA BACTERIORUBERINA EVIDENCIANDO OS VALORES DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS NA REGIÃO DE 5,4 A 6,8 ppm
 FONTE: RØNNEKLEIV *et al.* modificado (1995)

A análise por RMN de ^1H deverá ser realizada novamente após a purificação do extrato em acetona para que os sinais da bacterioruberina na região de 1 a 2 ppm possam ser visualizados, já que no espectro obtido, esses sinais não foram verificados devido à existência de outras substâncias em quantidades superiores à

da bacterioruberina na amostra. Análises de RMN 2D também deverão ser realizadas para a confirmação da existência da bacterioruberina no extrato em acetona das células secas da bactéria *Halorubrum saccharovorum*, bem como análises de RMN 1D e 2D no extrato em metanol das células da bactéria.

5.6 CULTIVOS PARA A VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES NA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E CAROTENOIDES TOTAIS

Uma vez que os resultados das análises cromatográficas e espectrométricas evidenciaram que a bactéria *Halorubrum saccharovorum* é capaz de produzir pigmentos carotenoides, como a bacterioruberina, um planejamento fatorial foi realizado.

O planejamento fatorial é útil na avaliação de fatores (k) que, atuando sobre um sistema, produzem respostas de interesse. Os fatores são as variáveis que podem ser controladas e são classificados como quantitativos, como por exemplo, a temperatura de cultivo, ou qualitativos, como o tipo de um componente do meio de cultivo. Esses fatores são avaliados em diferentes níveis (n), ou seja, em diferentes valores, quando os fatores são quantitativos, ou em diferentes classes, quando os fatores são qualitativos. Geralmente, é realizada uma codificação dos níveis dos fatores como nível baixo (-) e nível alto (+). Quando os níveis são quantitativos, é comum atribuir ao nível baixo o menor valor e quando são qualitativos, a atribuição é arbitrária. Logo, um planejamento fatorial completo é representado por n^k e é caracterizado pela realização de experimentos em todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores, ou seja, $n \times k$ (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

O planejamento fatorial permite determinar o efeito dos fatores na(s) resposta(s) de interesse e, para isso, um modelo estatístico que procura descrever o processo estudado na região experimental investigada é criado. Dessa maneira, são calculados os efeitos principais e os de interação. Os efeitos principais indicam o efeito de um fator específico na resposta de interesse e é, por definição, a média dos efeitos deste fator em todos os níveis do(s) outro(s) fator(es). O valor do efeito principal mostra o aumento, quando o efeito for positivo, ou a diminuição, quando o efeito for negativo, da resposta observada à medida que se passa de um nível ao

outro de um determinado fator. Os efeitos de interação, por sua vez, indicam que o efeito de um fator depende do nível de outro(s) fator(es), ou seja, indicam que os fatores interagem para fornecer a resposta. O efeito de interação é, por definição, a metade da diferença dos efeitos principais dos fatores. Esses efeitos podem ser provenientes de interações de dois, três, quatro ou mais fatores, sendo chamados, respectivamente, de efeitos de segunda ordem, terceira ordem, quarta ordem e, assim, sucessivamente. O valor do efeito de interação não tem interpretação prática, somente a sua magnitude deve ser avaliada. Quando o efeito de interação é significativo, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Neste trabalho foi realizado um planejamento fatorial 2^4 completo para verificar o efeito dos fatores pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de cultivo na formação de biomassa e de carotenoides totais.

Os fatores pH, temperatura e velocidade de agitação, a qual favorece o suprimento de oxigênio ao micro-organismo, foram avaliados porque estão entre os principais fatores necessários para o crescimento microbiano (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1994; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012a). O tempo de cultivo também foi avaliado porque a concentração de células e a concentração de carotenoides totais variam em função do tempo de cultivo.

A seleção dos níveis ou valores dos fatores foi baseada em dados da literatura para as condições de crescimento da bactéria *Halorubrum saccharovorum* e para as condições de produção de carotenoides por bactérias halofílicas do domínio *Archaea*, visto que não foram encontrados estudos de otimização da produção destes pigmentos pela bactéria *Halorubrum saccharovorum*. Assim, considerando as instruções da ATCC e o trabalho de Robinson *et al.* (2005) para as condições recomendadas de temperatura (entre 23°C e 55°C) e de pH (7,6) para o crescimento do micro-organismo, bem como os trabalhos de Asker e Ohta (1999) e de Fang *et al.* (2010) para as condições testadas para a produção de carotenoides por outras bactérias halofílicas, foram selecionados os valores de pH de 4,5 e 7,5, de temperatura de 25°C e 37°C, de velocidade de agitação de 100 rpm e 200 rpm e de tempo de cultivo de 48 horas e 72 horas.

Os dados da tabela 1 mostram as concentrações de células e carotenoides totais obtidas nas diversas combinações dos níveis dos fatores pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de cultivo da bactéria *Halorubrum saccharovorum*.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E CAROTENOIDES TOTAIS OBTIDAS NAS DIVERSAS COMBINAÇÕES DOS NÍVEIS DOS FATORES pH, TEMPERATURA, VELOCIDADE DE AGITAÇÃO E TEMPO DE CULTIVO

Ensaio	Fator				Resposta					
	pH	Temperatura	Velocidade de agitação	Tempo de cultivo	Concentração de células (g.L ⁻¹)			Concentração de carotenoides (µg por grama de células secas)		
					Média	Desvio padrão	Intervalo de confiança	Média	Desvio padrão	Intervalo de confiança
1	-	-	-	-	0,36	0,02	0,32 - 0,40	0,00	0,00	0,00
2	-	-	-	+	0,36	0,05	0,22 - 0,49	0,00	0,00	0,00
3	-	-	+	-	0,36	0,03	0,29 - 0,43	0,00	0,00	0,00
4	-	-	+	+	0,33	0,05	0,21 - 0,45	0,00	0,00	0,00
5	-	+	-	-	0,46	0,12	0,15 - 0,78	0,00	0,00	0,00
6	-	+	-	+	0,45	0,03	0,38 - 0,51	0,00	0,00	0,00
7	-	+	+	-	0,37	0,07	0,19 - 0,55	0,00	0,00	0,00
8	-	+	+	+	0,32	0,02	0,27 - 0,36	0,00	0,00	0,00
9	+	-	-	-	1,06	0,07	0,88 - 1,23	33,85	2,29	28,17 - 39,53
10	+	-	-	+	1,49	0,05	1,37 - 1,60	37,17	2,43	31,14 - 43,20
11	+	-	+	-	1,12	0,07	0,94 - 1,30	36,87	*	*
12	+	-	+	+	1,63	0,05	1,50 - 1,76	38,33	1,11	35,56 - 41,09
13	+	+	-	-	2,22	0,05	1,76 - 2,68	89,60	10,49	63,53 - 115,66
14	+	+	-	+	2,31	0,07	2,14 - 2,48	81,19	4,35	70,40 - 91,99
15	+	+	+	-	2,31	0,10	2,08 - 2,55	75,39	2,74	68,59 - 82,18
16	+	+	+	+	2,42	0,08	2,22 - 2,63	72,29	2,53	66,01 - 78,58

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Os sinais - e + indicam, respectivamente, os valores inferior e superior testados para cada fator avaliado (pH de 4,5 ou 7,5; temperatura de 25°C ou 37°C; velocidade de agitação de 100 rpm ou 200 rpm; tempo de cultivo de 48 ou 72 horas).

II- Os ensaios foram realizados em triplicata.

III- Os valores de concentração de células e carotenoides totais são apresentados como média, desvio padrão e intervalo de confiança.

* Os valores de desvio padrão e de intervalo de confiança do ensaio 11 não estão indicados porque dois valores de concentração de carotenoides totais (89,52 e 181,69 µg por grama de células secas) foram detectados como *outliers* pelo método de Análise de Variância (ANOVA).

IV- Os intervalos de confiança para cada uma das médias resultantes das combinações de níveis dos fatores foram construídos usando-se o nível de significância de 5% e o desvio padrão correspondente de cada amostra (n=3), adotando-se a distribuição de probabilidade t de Student.

As médias das concentrações de células e carotenoides totais foram comparadas pelo método de Tukey, ao nível de significância de 5%. A figura 22 mostra graficamente, do ensaio 1 ao 16, a comparação das médias das concentrações de células.

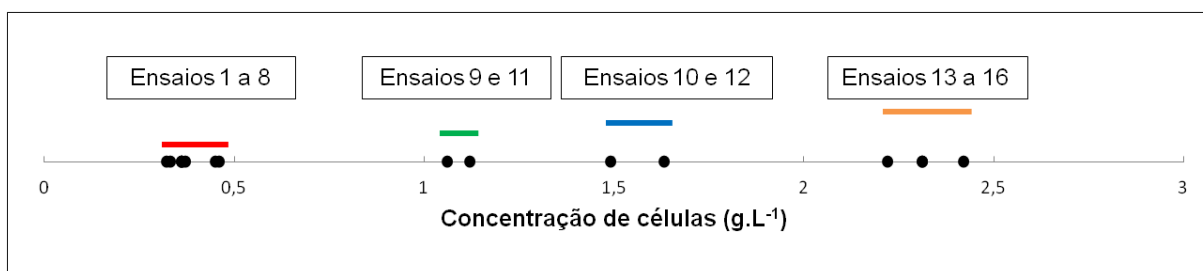


FIGURA 22 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS DOS ENSAIOS 1 A 16.

NOTA: I- As comparações múltiplas das médias obtidas para as combinações possíveis dos níveis dos fatores foram realizadas pelo método de Tukey, ajustado para que o nível de confiança simultâneo fosse de 95%.

II- Cada linha colorida indica os ensaios cujas médias são similares entre si.

A comparação de médias pelo método de Tukey, ao nível de significância de 5%, mostrou que houve diferença significativa entre as médias das concentrações de células dos seguintes grupos de ensaios: 1 a 8, 9 e 11, 10 e 12 e 13 a 16. Considerando que os ensaios 13 a 16 forneceram as maiores concentrações de células e que não foi verificada diferença significativa nas médias das concentrações celulares desses ensaios entre si, ou seja, as médias são similares, é possível concluir que a maior produção de biomassa ocorreu nos níveis mais altos dos fatores pH (7,5) e temperatura (37°C).

A figura 23 mostra graficamente a comparação das médias das concentrações de carotenoides totais dos ensaios 1 a 16.

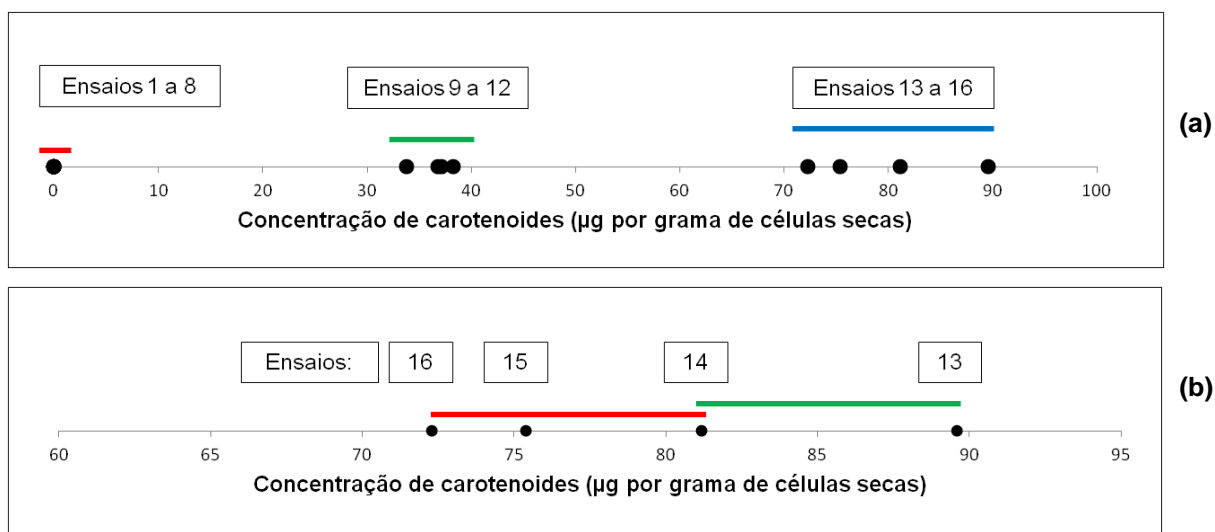


FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE CAROTENOIDES TOTAIS DOS ENSAIOS 1 A 16 (a) E DOS ENSAIOS 13 A 16 (b)

NOTA: I- As comparações múltiplas das médias obtidas para as combinações possíveis dos níveis dos fatores foram realizadas pelo método de Tukey, ajustado para que o nível de confiança simultâneo fosse de 95%.

II- Cada linha colorida indica os ensaios cujas médias são similares entre si.

III- A sobreposição das linhas coloridas indica a similaridade de médias entre grupos que apresentam médias iguais entre si. Dessa forma, a média do ensaio 14 é similar tanto às médias dos ensaios 15 e 16, quanto à média do ensaio 13.

Com isso, a comparação de médias pelo método de Tukey, ao nível de significância de 5%, evidenciou uma diferença significativa entre as médias das concentrações de carotenoides totais dos seguintes grupos de ensaios: 1 a 8, 9 a 12 e 13 a 16. Com relação aos ensaios 13 a 16, que apresentaram as maiores concentrações de carotenoides, as médias das concentrações foram similares nos ensaios 14, 15 e 16, bem como nos ensaios 13 e 14. Portanto, como a média do ensaio 14 não apresentou diferença significativa em relação às médias dos ensaios 15 e 16, não é possível considerar os ensaios 13 e 14 como aqueles com a maior produção de carotenoides. Pode-se concluir que a maior produção de carotenoides ocorreu nos ensaios 13 a 16, os quais correspondem aos níveis mais altos dos fatores pH (7,5) e temperatura (37°C).

Os efeitos principais e os efeitos de interação obtidos para a formação de biomassa e de carotenoides totais estão listados na tabela 2.

TABELA 2 - EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E CAROTENOIDES TOTAIS

Resposta	Fator	Efeito	p	R ²
Concentração de células	pH	1,44	< 0,001	0,9950
	temperatura	0,52	< 0,001	
	velocidade de agitação	0,02	0,298	
	tempo	0,13	< 0,001	
	pH*temperatura	0,47	< 0,001	
	pH*agitação	0,08	< 0,001	
	pH*tempo	0,15	< 0,001	
	temperatura*tempo	- 0,10	< 0,001	
	pH*temperatura*tempo	- 0,09	< 0,001	
Concentração de carotenoides	pH	57,95	< 0,001	0,9935
	temperatura	21,67	< 0,001	
	velocidade de agitação	- 2,50	0,011	
	tempo	- 0,70	0,456	
	pH*temperatura	21,67	< 0,001	
	pH*agitação	- 2,50	0,011	
	temperatura*agitação	- 3,27	0,001	
	temperatura*tempo	- 2,17	0,026	
	pH*temperatura*agitação	- 3,27	0,001	
pH*temperatura*tempo	- 2,17	0,026		

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- O asterisco (*) indica a interação entre dois ou três fatores.

II- Todos os efeitos principais e somente os efeitos de interação considerados significativos ($p < 0,05$) são mostrados na tabela.

III- O valor de R², quando multiplicado por 100, indica a porcentagem da variabilidade que foi contabilizada com as variáveis especificadas pelo modelo. Assim, um valor de R² próximo de 1,00 indica que quase toda a variabilidade foi contabilizada.

O pH, a temperatura e o tempo apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) na formação de biomassa pela bactéria *Halorubrum saccharovorum*. Esses fatores, especialmente o pH, proporcionaram maiores concentrações de células de 1,80 g.L⁻¹, 1,32 g.L⁻¹ e 1,16 g.L⁻¹ nos níveis mais altos testados, ou seja, no pH de 7,5, na temperatura de 37°C e no tempo de cultivo de 72 horas, respectivamente (FIGURA 24).

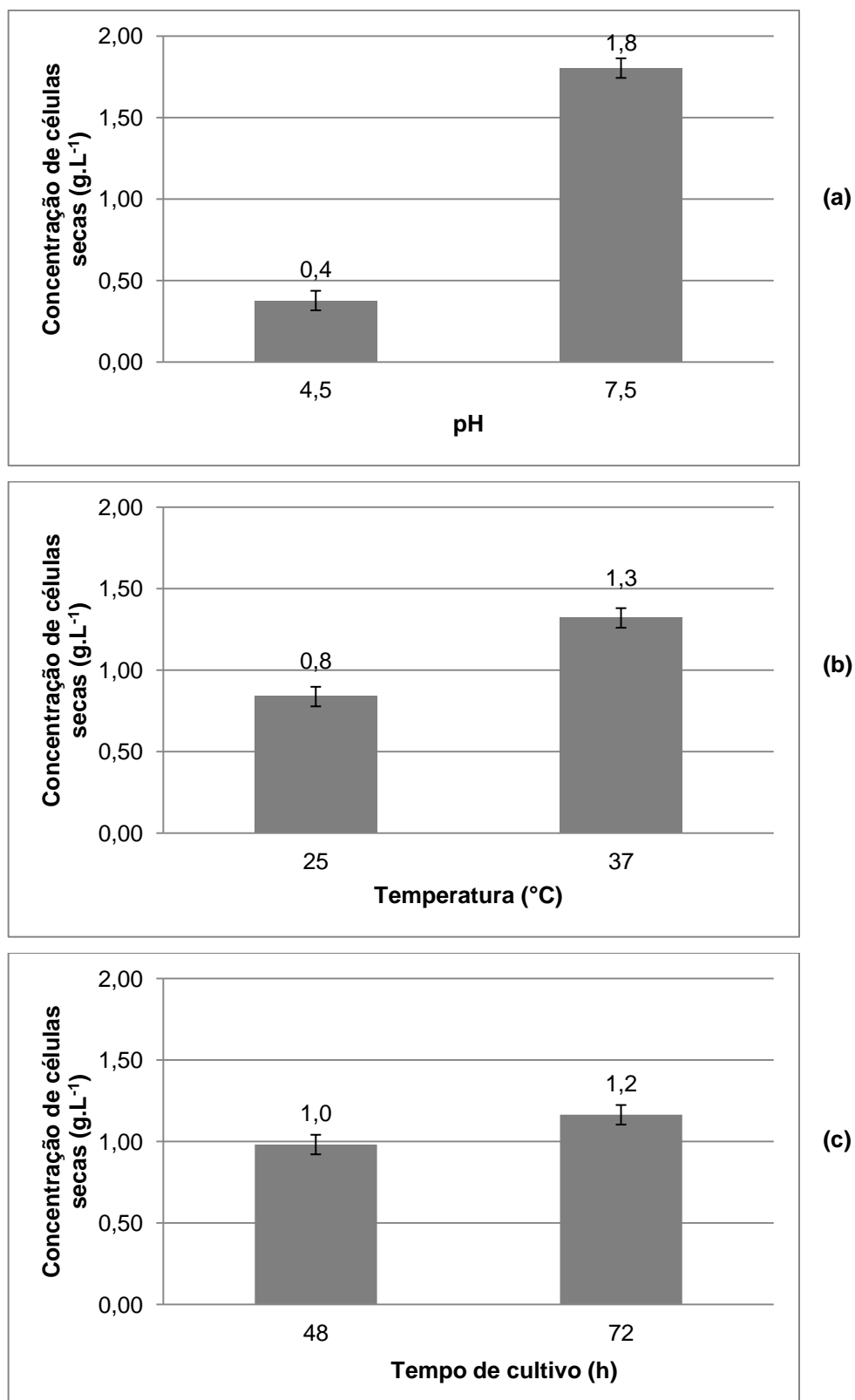


FIGURA 24 - EFEITOS PRINCIPAIS DO pH (a), DA TEMPERATURA (b) E DO TEMPO DE CULTIVO (c) NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Os valores das barras referem-se às médias das concentrações de células secas, e as barras de erros indicam o desvio padrão.

II- Somente os efeitos considerados significativos ($p < 0,05$) são mostrados na figura.

Entretanto, as interações de segunda ordem entre o pH e a temperatura, o pH e a agitação, o pH e o tempo, a temperatura e o tempo também foram significativas ($p < 0,05$) na formação de biomassa. O maior efeito foi observado na interação entre pH e temperatura, nos níveis mais altos, que forneceu a concentração de células de $2,32 \text{ g.L}^{-1}$. A interação entre o pH e o tempo, ambos nos níveis mais altos, mostrou efeito positivo menos intenso na concentração de células, a qual atingiu $1,96 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto a interação entre pH e agitação evidenciou efeito ainda menos intenso, fornecendo a concentração de células de $1,87 \text{ g.L}^{-1}$. Já a interação entre temperatura e tempo proporcionou um efeito negativo na formação de biomassa, e a maior concentração de células nos níveis mais altos desses fatores foi de apenas $1,37 \text{ g.L}^{-1}$ (FIGURA 25). A interação de terceira ordem entre pH, temperatura e tempo também apresentou efeito significativo negativo na concentração de células de magnitude similar ao efeito da interação da temperatura e do tempo.

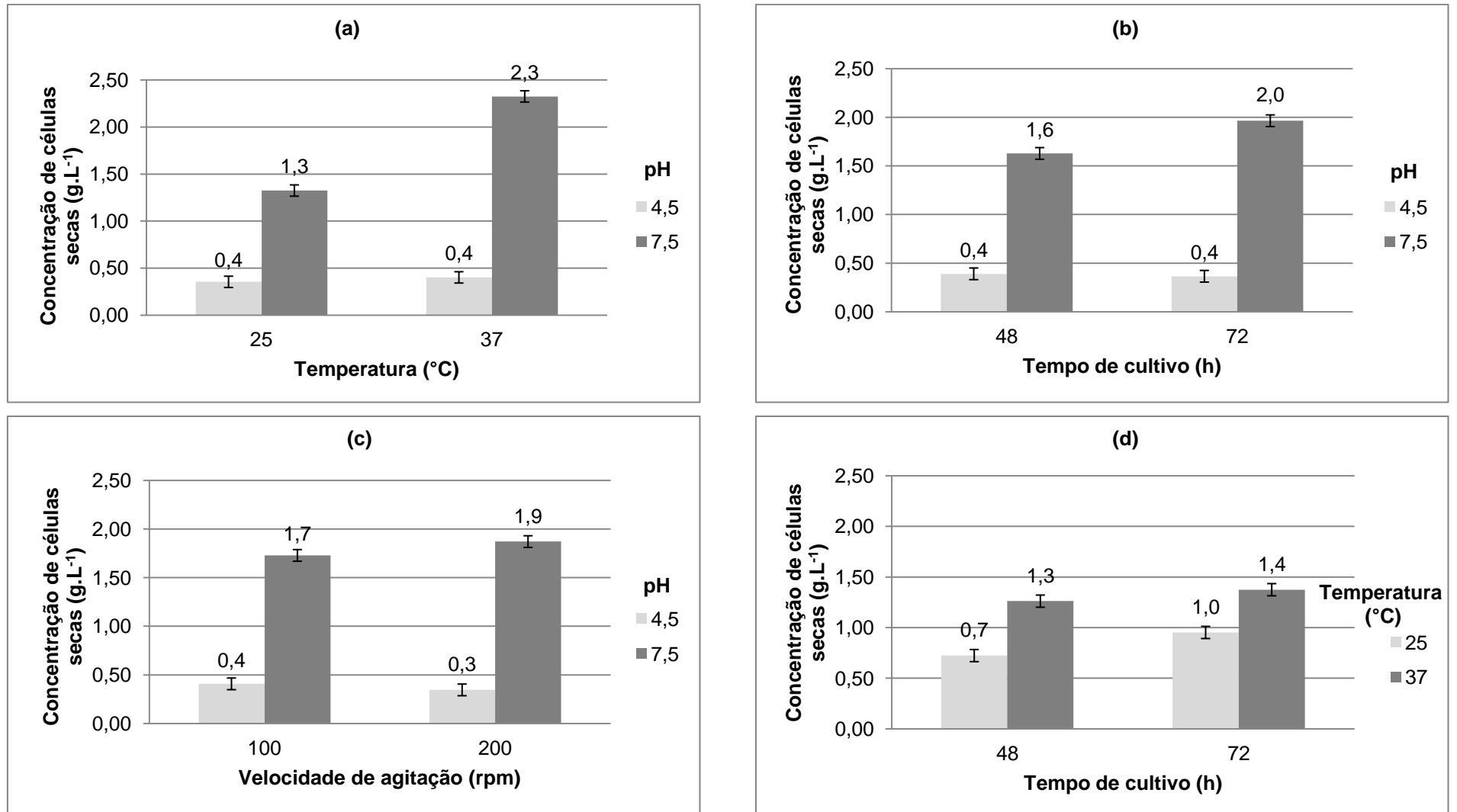


FIGURA 25 - EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM DO pH E DA TEMPERATURA (a), DO pH E DO TEMPO DE CULTIVO (b), DO pH e DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (c) E DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE CULTIVO (d) NA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Os valores das barras referem-se às médias das concentrações de células secas, e as barras de erros indicam o desvio padrão.

II- Somente os efeitos considerados significativos ($p < 0,05$) são mostrados na figura.

Quanto à formação de carotenoides, os fatores pH, temperatura e velocidade de agitação apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$); os dois primeiros proporcionaram efeitos positivos e, o último, negativo. O pH de 7,5 forneceu a maior concentração de carotenoides totais de 60,01 μg de carotenoides por grama de células secas, enquanto a temperatura de 37°C proporcionou a concentração de 39,81 μg de carotenoides por grama de células secas. Como a velocidade de agitação apresentou efeito negativo na formação de carotenoides totais, a maior concentração de carotenoides de 30,23 μg por grama de células secas foi verificada na velocidade de agitação de 100 rpm (FIGURA 26).

Todavia, como foi observado um efeito de interação positivo na concentração de carotenoides totais entre os fatores pH e temperatura, a maior concentração desses pigmentos foi de 79,62 μg de carotenoides por grama de células secas, no cultivo de pH inicial 7,5 e de temperatura de 37°C. Todos os outros efeitos de segunda ordem foram negativos e inferiores ao efeito observado para a interação entre pH e temperatura (FIGURA 27). Interações de terceira ordem também foram observadas e apresentaram efeitos de magnitudes iguais às aquelas referentes às interações entre temperatura e agitação, bem como entre temperatura e tempo.

Quanto ao pH dos cultivos realizados para o planejamento fatorial, os com pH inicial de 4,5 apresentaram aumento de pH para no máximo cerca de 5,3. Enquanto aqueles com pH inicial de 7,5 e mantidos a 25°C demonstraram diminuição do pH para cerca de 7,4, ao contrário dos cultivos mantidos a 37°C, os quais evidenciaram aumento de pH para cerca de 8,0.

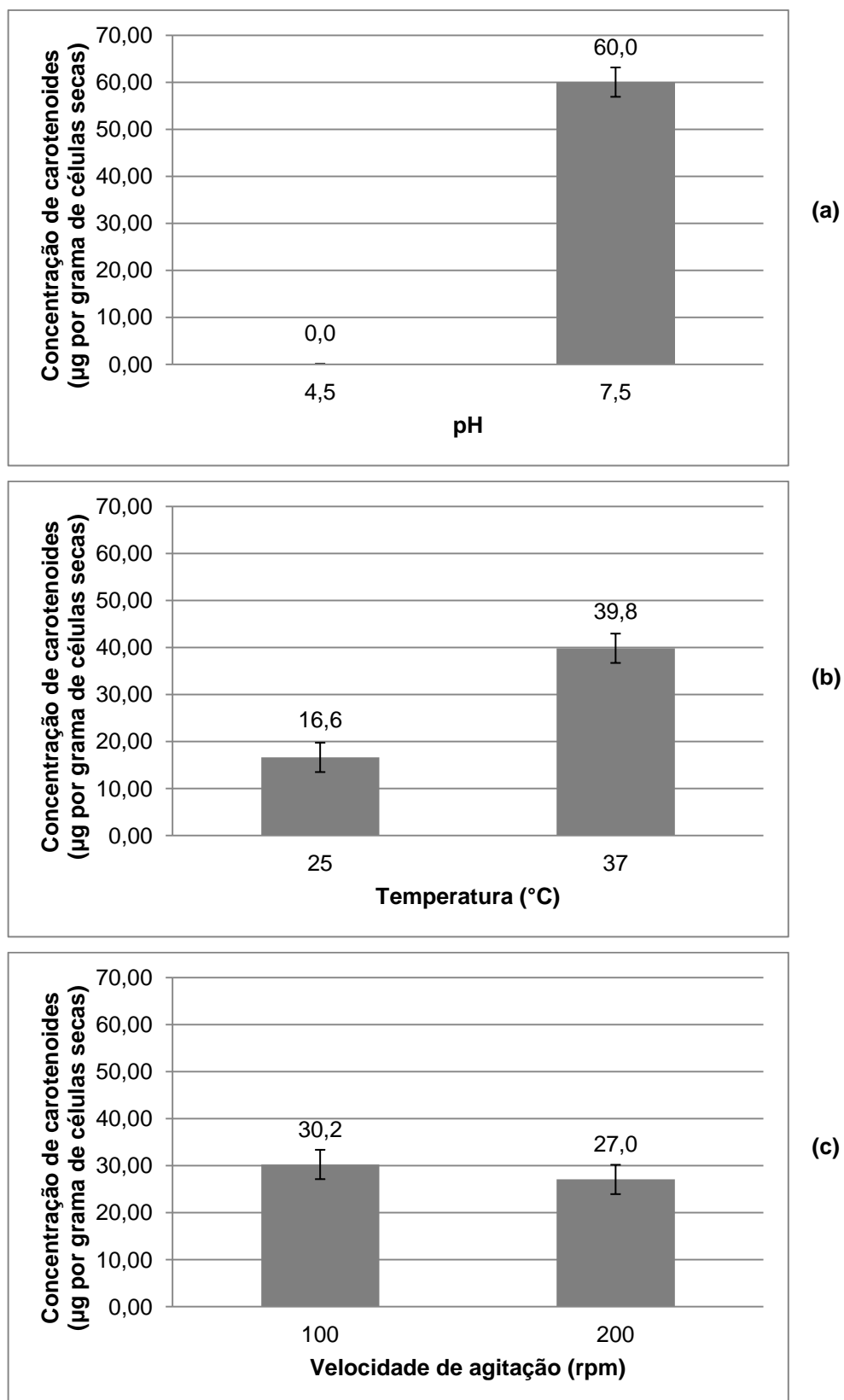


FIGURA 26 - EFEITOS PRINCIPAIS DO pH (a), DA TEMPERATURA (b) E DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (c) NA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Os valores das barras referem-se às médias das concentrações de carotenoides totais, e as barras de erros indicam o desvio padrão.

II- Somente os efeitos considerados significativos ($p < 0,05$) são mostrados na figura.

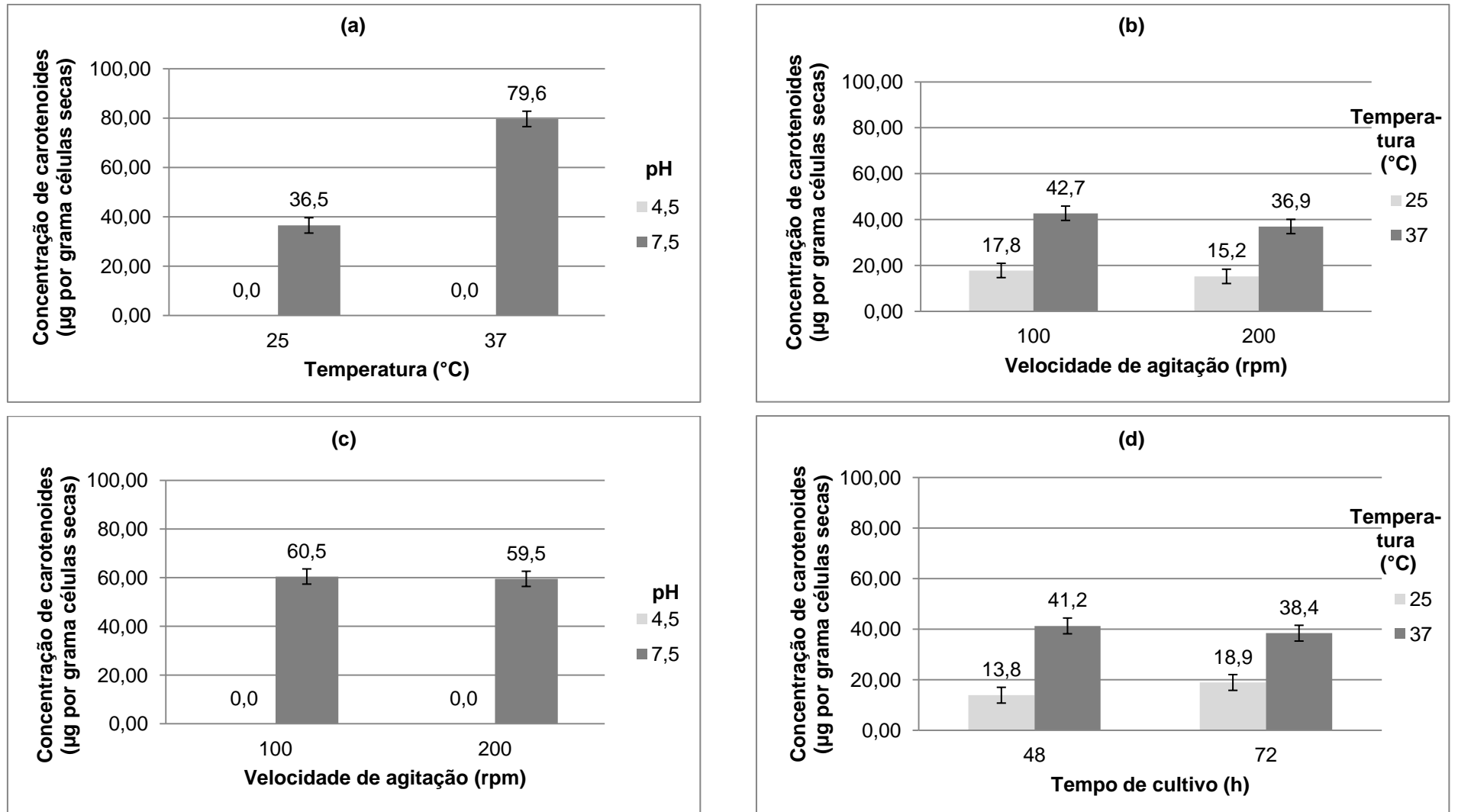


FIGURA 27 - EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM DO pH E DA TEMPERATURA (a), DA TEMPERATURA E DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (b), DO pH E DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO (c), DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE CULTIVO (d) NA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOÍDEOS TOTAIS

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- Os valores das barras referem-se às médias das concentrações de carotenoides totais, e as barras de erros indicam o desvio padrão.

II- Somente os efeitos considerados significativos ($p < 0,05$) são mostrados na figura.

Com isso, para a obtenção de maior concentração de carotenoides totais, o cultivo da bactéria *Halorubrum saccharovorum* deve ser conduzido em meio de cultivo que apresenta pH inicial de 7,5 e temperatura de 37°C. Quanto aos outros fatores, segundo a análise de otimização da concentração de carotenoides totais, realizada pelo *software* Minitab 7.0, os cultivos devem ser mantidos na velocidade de agitação de 100 rpm pelo tempo de cultivo de 48 horas.

Miranda (2010) também avaliou o efeito de diferentes fatores na produção de carotenoides pela bactéria halofílica *Halococcus morrhuae*. Para isso, realizou um planejamento fatorial 2^3 completo, avaliando o efeito da concentração de cloreto de sódio, do pH, da temperatura na formação de biomassa e de carotenoides pela bactéria, obtendo a máxima concentração de células de 7,98 g.L⁻¹ e de carotenoides de 252,7 µg por grama de células secas. Essas concentrações foram superiores às aquelas obtidas neste trabalho para a bactéria *Halorubrum saccharovorum*. Entretanto, no presente estudo foi verificado o efeito de diferentes condições de cultivo no crescimento e produção de carotenoides pela bactéria *Halorubrum saccharovorum*, sem a modificação da composição do meio de cultivo pela alteração da concentração de cloreto de sódio e de fontes de carbono, nitrogênio e minerais, que podem fornecer aumentos expressivos no crescimento celular e na produção de carotenoides.

5.7 CULTIVOS PARA A VERIFICAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOMASSA E CAROTENOIDES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Considerando o efeito da temperatura e do pH demonstrados pelo planejamento fatorial, a bactéria *Halorubrum saccharovorum* foi cultivada no meio com pH inicial de 7,5 e temperatura de 37°C. A figura 28 mostra as curvas de crescimento e formação de carotenoides totais obtidas em função do tempo de cultivo.

A bactéria apresentou crescimento significativo até 60 horas de cultivo, atingindo a concentração de células de 2,76 g.L⁻¹ no final da fase logarítmica do crescimento. A concentração de células permaneceu estável até 72 horas de cultivo e, após este período, foi observado um aumento de cerca de 0,3 g.L⁻¹. Esse

pequeno aumento na concentração celular, a partir do início da fase estacionária até 96 horas de cultivo, pode ter ocorrido devido à concentração residual de nutrientes e aos produtos do metabolismo presentes no meio.

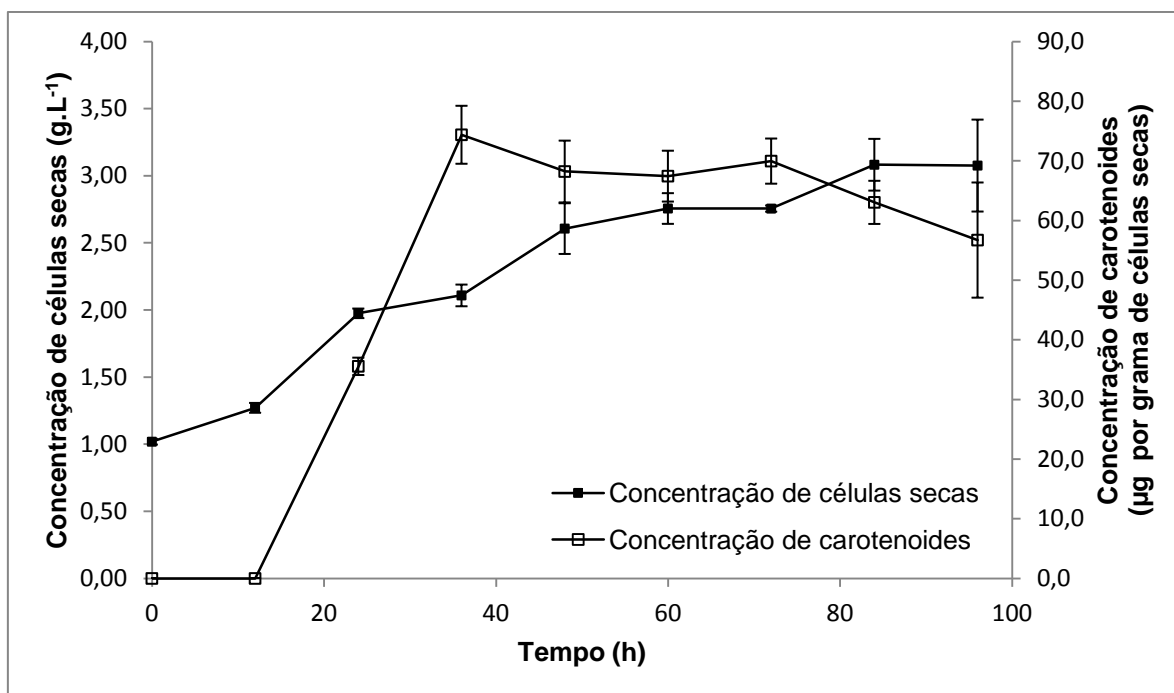


FIGURA 28 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS E CAROTENOIDES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DA BACTÉRIA *Halorubrum saccharovorum*

FONTE: O autor (2012)

NOTA: I- O experimento foi realizado em triplicata.

II- Os valores referem-se às médias das concentrações de células ou carotenoides totais, e as barras de erros indicam o desvio padrão.

O crescimento exponencial do micro-organismo foi acompanhado pela formação de pigmentos carotenoides. A concentração máxima de carotenoides totais obtida foi de aproximadamente 75 µg por grama de células secas, no tempo de cultivo de 36 horas. Após este período, ocorreu uma diminuição na concentração de carotenoides totais. Isso pode ser atribuído ao pequeno aumento na concentração de células após 36 horas de cultivo, o que provavelmente não foi acompanhado por aumento na formação de carotenoides.

Asker e Ohta (1999) demonstraram que a bactéria halofílica *Haloferax alexandrinus* apresentou uma longa fase lag (de aproximadamente 2 dias). E a produção de pigmento foi observada após 4 dias de cultivo, quando este se tornou levemente alaranjado. O crescimento e a produção de carotenoides aumentaram até

atingirem os valores máximos de 3 de densidade óptica a 660 nm e 10 de densidade óptica a 490 nm, respectivamente, após 6 dias de cultivo, quando ocorreu nova diminuição. Em condições ótimas, a bactéria produziu 2,06 mg de carotenoides totais por grama de células secas. Dessa forma, a concentração de carotenoides totais obtida por Asker e Ohta (1999) foi maior do que a alcançada no presente trabalho. Porém, o tempo de cultivo para a obtenção desses pigmentos foi maior (7 dias) em relação ao tempo apresentado pela bactéria *Halorubrum saccharovorum* (36 horas).

Miranda (2010), utilizando as bactérias *Halococcus morrhuae* e *Halobacterium salinarum*, obteve as concentrações de carotenoides totais de 87,9 µg por grama de células secas e 44,5 µg por grama de células secas, respectivamente, após 7 dias de cultivo na temperatura de 37°C e velocidade de agitação de 200 rpm. Esses valores são semelhantes aos apresentados neste trabalho para a bactéria *Halorubrum saccharovorum*.

Os valores de produtividade em biomassa e em carotenoides totais obtidos para o processo foram compilados na tabela 3.

TABELA 3 - VALORES DE PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA E PRODUTIVIDADE EM CAROTENOIDES TOTAIS OBTIDOS NO CULTIVO DO MICRO-ORGANISMO *Halorubrum saccharovorum* NA TEMPERATURA DE 37°C E VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DE 150 rpm

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (µg.mL ⁻¹ .h ⁻¹)
12	0,021	0,006
24	0,040	0,024
36	0,030	0,045
48	0,033	0,039
60	0,029	0,031
72	0,024	0,027
84	0,024	0,023
96	0,021	0,018

FONTE: O autor (2012)

NOTA: P_x refere-se à produtividade em biomassa e P_p , à produtividade em carotenoides totais .

O maior valor de produtividade em biomassa foi verificado entre os tempos de cultivo de 12 e 24 horas. Já o maior valor de produtividade em carotenoides totais foi evidenciando entre os tempos de 24 e 36 horas.

O pH do cultivo permaneceu praticamente estável até 24 horas, apresentando um pequeno aumento até 48 horas de cultivo, quando o pH atingiu o valor de 7,919. Após esse período, o potencial hidrogeniônico do cultivo permaneceu praticamente estável novamente.

6 CONCLUSÕES

- Um protocolo para a obtenção e identificação de carotenoides produzidos pela bactéria *Halorubrum saccharovorum* foi desenvolvido.
- A bactéria *Halorubrum saccharovorum* é capaz de produzir o pigmento carotenoide bacterioruberina.
- Os principais fatores que afetaram positivamente a produção de carotenoides totais pela bactéria *Halorubrum saccharovorum* foram a temperatura (37°C) e o pH (7,5).
- A maior produção de carotenoides totais, entre cerca de 72 e 90 µg de carotenoides por grama de células secas, foi observada nas condições de pH de 7,5 e temperatura de 37°C.

REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, F. Elementos de microbiologia. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 1-32.

ASKER, D.; AWAD, T.; OHTA, Y. Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TM^T: an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 93, n. 1, p. 37-43, 2002.

ASKER, D.; OHTA, Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 88, n. 6, p. 617-621, 1999.

ATCC - American Type Culture Collection. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/4067.pdf>>. Acesso em: 26/08/2011.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**. v. 9, n. 15, p. 1551-8, 1995a.

BRITTON, G. UV/Visible Spectroscopy. In: BRITTON, G.; SYNNØVE, L.-J.; PFANDER, H. **Carotenoids Volume 1B: Spectroscopy**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1995b. p. 13-62.

BRITTON, G.; SYNNØVE, L.-J.; PFANDER, H. Carotenoids Today and Challenges for the Future. In: BRITTON, G.; SYNNØVE, L.-J.; PFANDER, H. **Carotenoids. Volume 1A: Isolation and Analysis**. Basel: Birkhäuser, 1995. p. 13-26.

CALO, D.; EICHLER, J. Crossing the membrane in Archaea, the third domain of life. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**. v. 1808, n. 3, p. 885-891, 2011.

CALO, P. *et al.* Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and *trans*-astaxanthin. **Journal of Applied Microbiology**. v. 79, n. 3, p. 282-285, 1995.

CAMPO, J.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, n. 6, p. 1163-1174, 2007.

CARDOSO, A. M. *et al.* Archaea: Potencial Biotecnológico. **Bioteconologia Ciência e Desenvolvimento** v. 6, n. 30, p. 71-77, 2003.

CATALOGUE OF LIFE. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/>>. Acesso em: 19/03/2012.

CHAPMAN, M. S. Vitamin A: History, Current Uses, and Controversies. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. v. 31, n. 1, p. 11-16, 2012.

CHRISTAKI, E. *et al.* Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 93, n. 1, p. 5-11, 2013.

COWAN, D. A. Biotechnology of the Archaea. **Trends in Biotechnology**. v. 10, p. 315-323, 1992.

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. **Archives of Microbiology**. v. 168, n. 1, p. 68-71, 1997.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press, 1976. p. 38-165.

EL-SAYED, W. S. *et al.* Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. **Plant and Cell Physiology**. v. 43, n. 4, p. 379-383, 2002.

EVANS, R. W.; KUSHWAHA, S. C.; KATES, M. The lipids of *Halobacterium marismortui*, an extremely halophilic bacterium in the dead sea. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**. v. 619, n. 3, p. 533-544, 1980.

FALB, M. *et al.* Metabolism of halophilic archaea. **Extremophiles**. v. 12, n. 2, p. 177-196, 2008.

FANG, C.-J. *et al.* Influence of nutritive factors on C₅₀ carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 16, p. 6487-6493, 2010.

FONG, N. J. C. *et al.* Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, n. 5, p. 750-756, 2001.

IGIELSKA-KALWAT, J.; WAWRZYNCZAK, A.; NOWAK, I. β -Carotene as an exemplary carotenoid and its application in cosmetic industry. **Chemik**. v. 66, n. 2, p. 140-144, 2012.

ILIC, D.; MISSO, M. Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: A systematic review. **Maturitas**. v. 72, n. 4, p. 269-276, 2012.

KATES, M. The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**. v. 15, n. 4, p. 301-342, 1977.

KELLY, M.; JENSEN, S. L. Bacterial carotenoids. XXVI. C₅₀-carotenoids. 2. Bacterioruberin. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 21, n. 9, p. 2578-2580, 1967.

KELLY, M.; NORGDARD, S.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids. XXXI. C₅₀ carotenoids 5. Carotenoids of *Halobacterium salinarum*, Especially Bacterioruberin. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 24, n. 6, p. 2169-2182, 1970.

KRAMER, J. K. G.; KUSHWAHA, S. C.; KATES, M. Structure determination of the squalene, dihydrosqualene and tetrahydrosqualene in *Halobacterium cutirubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**. v. 270, n. 1, p. 103-110, 1972.

KUSHWAHA, S. C. *et al.* Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 28, n. 12, p. 1365-1372, 1982.

KUSHWAHA, S. C.; KATES, M. Isolation and identification of "bacteriorhodopsin" and minor C₄₀-carotenoids in *Halobacterium cutirubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**. v. 316, n. 2, p. 235-243, 1973.

KUSHWAHA, S. C.; KRAMER, J. K. G.; KATES, M. Isolation and characterization of C₅₀-carotenoid pigments and other polar isoprenoids from *Halobacterium cutirubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**. v. 398, n. 2, p. 303-314, 1975.

KUSHWAHA, S. C. *et al.* Isolation and identification of dehydrosqualene and C₄₀-carotenoid pigments in *Halobacterium cutirubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**. v. 260, n. 3, p. 492-506, 1972.

LAZRAC, T. *et al.* Bacterioruberins reinforce reconstituted *Halobacterium* lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**. v. 939, n. 1, p. 160-162, 1988.

LOBASSO, S. *et al.* Lipids of the ultra-thin square halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*. **Archaea (Vancouver, B.C.)**. v. 2, n. 3, p. 177-183, 2008.

LUNA-FLORES, C. H. *et al.* Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. **Biochemical Engineering Journal**. v. 53, n. 1, p. 131-136, 2010.

MADIGAN, M. T. *et al.* *Archaea*. In: _____. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2012a. p. 487-515.

MADIGAN, M. T. *et al.* Estrutura e Função Celular em *Bacteria* e *Archaea*. In: _____. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre Artmed, 2012b. p. 66-106.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**. v. 107, n. 1, p. 145-150, 2008.

MANDELLI, F. *et al.* Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, n. 4, p. 1781-1790, 2012.

MAROVA, I. *et al.* Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. **Journal of Environmental Management**. v. 95, Supplement, n. p. S338-S342, 2012.

MIRANDA, V. S. **Carotenóides de bactérias halófilas: produção, caracterização e atividade antioxidante**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MURIANA, F. J. G.; ALVAREZ-OSSORIO, M. C.; RELIMPIO, A. M. Purification and characterization of aspartate aminotransferase from the halophile archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. **Biochemical Journal**. v. 278, n. 1, p. 149-54, 1991.

NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: _____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010. p. 99-144.

NISHINO, H. *et al.* Cancer prevention by carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 483, n. 2, p. 165-168, 2009.

OREN, A. Biotechnological Applications and Potentials of Halophilic Microorganisms In: _____. **Halophilic Microorganisms and their Environments**. Netherlands: Kluwer, 2002a. p. 357-388.

OREN, A. Halophilic Microorganisms in their Natural Environment and in Culture — an Historical Introduction In: _____. **Halophilic Microorganisms and their Environments**. Netherlands: Kluwer, 2002b. p. 3-16.

OREN, A. Pigments of Halophilic Microorganisms Halophilic Microorganisms and their Environments. In: _____. Netherlands: Kluwer, 2002c. p. 173-206.

PAPAIOANNOU, E. H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. **Food and Bioproducts Processing**. v. 88, n. 2–3, p. 305-311, 2010.

PFANDER, H. C₄₅- and C₅₀- carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**. v. 66, n. 10-11, p. 2369-2374, 1994.

PRASAIN, J. K. *et al.* Electrospray tandem mass spectrometric analysis of zeaxanthin and its oxidation products. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 40, n. 7, p. 916-923, 2005.

RIVERA, S.; VILARÓ, F.; CANELA, R. Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: effect of several dopants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 400, n. 5, p. 1339-1346, 2011.

RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**. v. 1224, p. 1-10, 2012.

ROBINSON, J. L. *et al.* Growth Kinetics of Extremely Halophilic Archaea (Family *Halobacteriaceae*) as Revealed by Arrhenius Plots. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n. 3, p. 923-929, 2005.

RØNNEKLEIV, M. *et al.* Three dodecaene C₅₀-carotenoids from halophilic bacteria. **Phytochemistry**. v. 39, n. 3, p. 631-634, 1995.

RØNNEKLEIV, M.; SYNNEVE, L.-J. Bacterial Carotenoids. 52. C₅₀-Carotenoids. 22. Naturally Occurring Geometrical Isomers of Bacterioruberin. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 46, n. p. 1092-1095, 1992.

RØNNEKLEIV, M.; SYNNEVE, L.-J. Bacterial carotenoids 53, C₅₀-carotenoids 23; Carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 23, n. 6, p. 627-634, 1995.

SCHIRALDI, C.; GIULIANO, M.; DE ROSA, M. Perspectives on biotechnological applications of archaea. **Archaea**. v. 1, n. 2, p. 75-86, 2002.

SCHWEIGGERT, U. *et al.* Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 19, n. 18, p. 2617-2628, 2005.

SINGH, O. V.; GABANI, P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. **Journal of Applied Microbiology**. v. 110, n. 4, p. 851-861, 2011.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Aeration and agitation. In: _____. **Principles of fermentation technology**. Bodmin: MPG, 1994. p. 243-275.

STIEHL, T.; RULLKÖTTER, J.; NISSENBAUM, A. Molecular and isotopic characterization of lipids in cultured halophilic microorganisms from the Dead Sea and comparison with the sediment record of this hypersaline lake. **Organic Geochemistry**. v. 36, n. 9, p. 1242-1251, 2005.

STRAND, A.; SHIVAJI, S.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids 55. C₅₀-carotenoids 25.† Revised structures of carotenoids associated with membranes in psychrotrophic *Micrococcus roseus*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 25, n. 6, p. 547-552, 1997.

TINDALL, B. J. A Comparative Study of the Lipid Composition of *Halobacterium saccharovorum* from Various Sources. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 13, n. 2, p. 128-130, 1990.

TOMLINSON, G. A.; HOCHSTEIN, L. I. Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 18, n. 5, p. 698-701, 1972.

TOMLINSON, G. A.; HOCHSTEIN, L. I. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 22, n. 4, p. 587-591, 1976.

TORNABENE, T. G. *et al.* Occurrence of squalene, di- and tetrahydrosqualenes, and vitamin MK₈ in an extremely halophilic bacterium, *Halobacterium cutirubrum*. **Journal of Lipid Research**. v. 10, n. 3, p. 294-303, 1969.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento microbiano. In: _____. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012a. p. 156-183.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Observando micro-organismos através do microscópio. In: _____. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012b. p. 54-75.

VACHALI, P.; BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial carotenoids. In: BARREDO, J.-L. **Microbial Carotenoids from Fungi: methods and protocols**. New York: Springer, 2012. p. 41-59.

VÍLCHEZ, C. *et al.* Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. **Marine Drugs**. v. 9, n. 3, p. 319-333, 2011.

YACHAI, M. **Carotenoid Production by Halophilic Archaea and Its Applications**. 173 f. Tese (Doutorado) - Tecnologia de alimentos, Prince of Songkla University, Hat Yai, 2009.