



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos**



**Bactéria termófila *Thermus filiformis*: produção de carotenoides
e avaliação da capacidade antioxidante**

Fernanda Mandelli
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Orientadora

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

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M312b Mandelli, Fernanda
Bactéria termófila *Thermus filiformis*: produção de carotenoides e
avaliação da capacidade antioxidante / Fernanda Mandelli. --
Campinas, SP: [s.n], 2010.

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

1. Carotenoides. 2. Bactéria termófila. 3. Capacidade
antioxidante. 4. Planejamento fatorial. 5. Termozeaxantinas I.
Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Thermophilic bacterium thermus filiformis: production of carotenoids and
evaluation of antioxidant capacity

Palavras-chave em inglês (Keywords): Carotenoids, Thermophilic bacterium, Antioxidant
capacity, Factorial design, Thermozeaxanthins

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Adriana Zerlotti Mercadante
Adelia Ferreira de Faria Machado
Fabio Marcio Squina

Data da Defesa: 26/08/2010

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por Fernanda Mandelli, aprovado pela comissão julgadora em 26 de agosto de 2010.

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(orientadora)

Dra. Adelia Ferreira de Faria Machado
(membro)

Dr. Fabio Marcio Squina
(membro)

Prof. Dr. Fábio Yamashita
(membro)

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
(membro)

Dedico este trabalho a minha mãe Marli A. P. Mandelli, ao meu pai Itacir A. Mandelli (in memoriam) e a minha irmã Daniela Mandelli pelo amor, incentivo e apoio a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e por me mostrar os caminho nas horas.

A minha mãe, meu pai (*in memorian*) e minha irmã, pelo amor incondicional.

Aos meus padrinhos, tios, primos e avós que mesmo distantes sempre me apoiaram na busca desta conquista.

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

À banca examinadora, Dra. Adelia Ferreira de Faria Machado, Dr. Fabio Marcio Squina, Dr. Fábio Yamashita e Dra. Gabriela Alves Macedo, pelas contribuições, sugestões e atenção dedicadas ao aperfeiçoamento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Toxinas Microbianas em especial ao Prof. José Luiz Pereira por todos os ensinamentos e atenção.

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

A todos do Laboratório de Química de Alimentos pela amizade, carinho, contribuição e auxílio em todos os momentos.

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

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

EPÍGRAFE

“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos”. (Lao-Tsé)

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”.
(Anatole France)*

ÍNDICE

ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMO GERAL	xiii
SUMMARY.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS.....	4
OBJETIVOS	5

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Micro-organismos extremos.....	7
1.1 Micro-organismos termófilos.....	8
1.2 Micro-organismos do gênero <i>Thermus</i> sp.....	10
2. Estrutura química, propriedades e funções de carotenoides.....	12
3. Composição de carotenoides em alguns micro-organismos extremófilos.....	16
4. Variáveis envolvidas no processo de produção de carotenoides por micro-organismos .	19
5. Referências	21

CAPÍTULO II

Composição e capacidade antioxidante do extrato de carotenoides produzido por bactéria termófila

Resumo	27
Introdução	28
Material e métodos.....	29
Material biológico e condições de cultivo.....	29
Padrões e Reagente.....	30
Extração e determinação dos carotenoides.....	30
Análise por HPLC-DAD-MS/MS	31
Capacidade de desativação do ABTS* ⁺	31
Capacidade de desativação do H ₂ O ₂	32
Resultados e discussão.....	33
Carotenoides de <i>Thermus filiformis</i>	33
Capacidade antioxidante.....	37
Agradecimentos	38
Referências.....	39

CAPÍTULO III

Evaluation by fractional factorial design of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity from *Thermus filiformis*

ABSTRACT.....	42
INTRODUCTION	43

MATERIALS AND METHODS.....	45
Bacterial strain.....	45
Culture medium and conditions.....	45
Experimental design and statistical analysis	46
Determination of dry biomass	47
Determination of carotenoids	47
Determination of antioxidant activity.....	48
RESULTS	48
Effect of the independent variables on biomass production.....	50
Effect of the independent variables on carotenoid production.....	51
Effect of the independent variables on antioxidant capacity	53
DISCUSSION.....	54
ACKNOWLEDGEMENTS	55
REFERENCES	55
CONCLUSÃO GERAL	58
ANEXO.....	59

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Micro-organismos procariotos que crescem em altas temperaturas.....	9
Tabela 2: Características de diferentes espécies de <i>Thermus</i>	11
Tabela 3: Aplicação de carotenoides na indústria de alimentos.	13

CAPÍTULO II

Composição e capacidade antioxidante do extrato de carotenoides produzido por bactéria termófila

Tabela 1: Características dos carotenoides, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, produzidos por <i>T. filiformis</i>	34
--	----

CAPÍTULO III

Evaluation by fractional factorial design of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity from *Thermus filiformis*

Table 1: Independent variable levels used in the fractional factorial design.....	46
Table 2: Matrix with coded values of the fractional factorial design 2^{5-1} and responses obtained for <i>Thermus filiformis</i>	49
Table 3: Effect of the variables on the biomass production, total carotenoid production and protection against singlet oxygen (only the significant values are shown).	50
Table 4: Main carotenoids produced by <i>T. filiformis</i>	53

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Aplicação de micro-organismos extremófilos na biotecnologia, medicina e indústria. Fonte: Morozkina et al. (2010).	8
Figura 2: Estrutura do principal carotenoide de <i>M. ruber</i>	16
Figura 3: Principais carotenoides de <i>Chlorobium tepidum</i> cepa TNO.	16
Figura 4: Carotenoides de <i>Halobacterium salinarium</i> e <i>Haloferax volcanii</i>	17
Figura 5: Carotenoides majoritários de <i>Heliorestis daurensis</i> e <i>H. baculata</i>	18
Figura 6: Estrutura das termocriptoxantinas (R1 = Z e R2 = H) e das termozeaxantinas (R1 = R2 = Z) isoladas de <i>Thermus thermophilus</i>	19

CAPÍTULO II

Composição e capacidade antioxidante do extrato de carotenoides produzido por bactéria termófila

Figura 1: Cromatograma dos carotenoides de <i>T. filiformis</i> obtidos por HPLC-DAD. Condições cromatográficas: ver texto. Processado a 450 nm.	33
Figura 2: Estrutura química dos carotenoides identificados em <i>T. filiformis</i> . (a) zeaxantina; (b) zeaxantina monoglicosilada; (c) termozeaxantina-11 a 15.	35
Figura 3: Capacidade de desativação do H ₂ O ₂ do extrato rico em carotenoides de <i>T. filiformis</i> . Cada ponto representa os valores obtidos de três experimentos, realizados em triplicata (média ± desvio-padrão).	38

CAPÍTULO III

Evaluation by fractional factorial design of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity from *Thermus filiformis*

Figure 1: Zeaxanthin monoglucoside esterified with branched fatty acids.	52
Figure 2: Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of the carotenoids from <i>Thermus filiformis</i> from assay 8. Peak characterization is given in Table 4. Chromatographic conditions: see text.	52

RESUMO GERAL

Os carotenoides pertencem a um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza, com grande diversidade de estruturas e funções. O interesse pelos carotenoides tem aumentado consideravelmente nos últimos anos pela evidência dos seus já conhecidos benefícios à saúde humana, devido às suas propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas e imunomodulatórias. As principais fontes industriais de carotenoides são a síntese química e a extração a partir de plantas. Porém, são poucos os carotenoides que possuem métodos economicamente eficientes de produção. Uma alternativa para a obtenção natural destes pigmentos é a sua produção por micro-organismos, sendo uma das fontes as bactérias termófilas que, em sua maioria, possuem carotenoides com estrutura específica para fortalecimento da membrana celular. Assim sendo, o presente estudo tem como objetivos: identificar os carotenoides da linhagem *Thermus filiformis* ATCC 43280, avaliar o crescimento de massa celular, produção de carotenóides e porcentagem de proteção contra o oxigênio singlete através de diferentes condições de cultivo e verificar a atividade antioxidante do extrato rico em carotenoides na desativação do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e do peróxido de hidrogênio. Para atingir os objetivos, os carotenoides foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência conectada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS), e as condições de cultivo e a interação entre as variáveis foram estudadas através de planejamento estatístico fatorial. Foram identificados nove carotenoides sintetizados pela bactéria *Thermus filiformis*, todos apresentando o mesmo comprimento de onda máximo a 449 ± 1 nm, que é um indicativo de um cromóforo de 11 ligações duplas conjugadas, sendo duas em anel β . O carotenoide majoritário identificado em *T. filiformis* foi termozeaxantina-15 que consiste do carotenoide zeaxantina ligada a uma glicose acilada com ácido graxo ramificado de 15 carbonos ((3*R*,3'*R*)-3'-[(6-*O*-13-metiltetradecanoil- β -D-glucopiranosil)oxi]- β , β -caroten-3-ol) o que representa 35,3 % do conteúdo total de carotenóides. Foram também identificados os carotenoides: zeaxantina (14,4 %), zeaxantina monoglicosilada (4,7 %) e termozeaxantinas com ácidos graxos ramificados, com cadeia de

cadeia de 11 (2,3 %), 12 (5,2 %), 13 (25,4 %) e 14 (9,0 %) carbonos, além de derivados dos carotenoides termozeaxantina-13 (0,8 %) e termozeaxantina-15 (2,8 %). Dentre as variáveis estudadas no planejamento experimental (temperatura, pH, quantidade de triptona, extrato de levedura e elementos traços de Nitsch's), a temperatura foi a que mais influenciou a quantidade de biomassa, carotenoides totais e proteção proporcionada pelos carotenoides contra oxigênio singlete. Com a utilização desta ferramenta foi possível atingir valores de 658 mg/L de biomassa seca, 1517 µg/g de carotenoides totais e porcentagem de proteção conferida ao DMA (dimetilantraceno) frente a oxidação por oxigênio singlete na ordem de 85 %. O extrato rico em carotenoides de *T. filiformis* apresentou capacidade de desativar o radical ABTS^{•+} com valor de capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) de 2,87, valor este superior aos relatados para outros carotenoides como β-caroteno (1,9) e zeaxantina (1,4).

Palavras-chave: carotenoides, bactéria termófila, capacidade antioxidante, planejamento fatorial, HPLC-DAD-MS/MS, termozeaxantinas.

SUMMARY

Carotenoids are a group of natural pigments widely distributed in the nature with great diversity of structures and functions. The interest on carotenoids has considerably increased in recent years by the evidence of its known benefits to human health, due to its antioxidant, anticarcinogenic and immunomodulatory properties. The main industrial sources of carotenoids are chemical synthesis and extraction from plants. However, there are few carotenoids which production is economically feasible. An alternative to obtain these natural pigments is their production by microorganisms, and one of the sources is the thermophilic bacterium that produces carotenoids with specific structure for the strength of cell membrane. Therefore the aims of this work were to evaluate the biomass, carotenoid production and quenching of singlet oxygen by the strain *Thermus filiformis* ATCC 43280 through different cultivation conditions and to verify the antioxidant activity by scavenging of the ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)) radical and hydroxy peroxide deactivation. In order to achieve these aims, the carotenoids were characterized by high-performance liquid chromatography connected to a photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-DAD-MS/MS), and the cultivation conditions and the interactions between the variables were studied using a fractionated factorial design. Nine carotenoids synthesized by *Thermus filiformis*, were identified, all showing the same maximum absorbance wavelength, indicating the presence of a chromophore of 11 conjugated double bounds, being two in the β -ring. The major carotenoid identified in *T. filiformis* was thermozeaxanthin-15 which is the carotenoid zeaxanthin linked to a glucose, acylated with a branched fatty acid of 15 carbons ((3*R*, 3'*R*) -3'- [(6-*O*-13-methyltetradecanoyl- β -D-glucopyranosyl) oxy]- β , β -carotene-3-ol) what represents 35.3 % of the total content of carotenoides. Zeaxanthin (14.4 %), zeaxanthin monoglucoside (4.7 %) and thermozeaxanthins with branched fatty acids chain with 11 (2.3 %), 12 (5.2 %), 13 (25.4 %) and 14 (90 %) carbons, besides thermozeaxanthin-13 (0,8 %) and thermozeaxanthina-15 (2,8 %) derivatives were also identified. Among the studied variables in the experimental design (temperature, pH, tryptone, yeast extract and Nitsch's

trace elements) the temperature was the one that most influenced the biomass amount, total carotenoids and percentage of protection against singlet oxygen. Using this tool, it was possible to achieve values of 658 mg/L of dry biomass, 1517 $\mu\text{g/g}$ of total carotenoids and percentage of protection of DMA (dimethylantracene) against the oxidation by singlet oxygen about 85 %. The extract rich in carotenoids from *T. filiformis* showed capacity of scavenging ABTS^{•+} radical with Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of 2.87, being this value higher than those reported in the literature for β -carotene (1.9) and zeaxanthin (1.4).

Key-words: carotenoids, thermophilic bacterium, antioxidant capacity, factorial design, HPLC-DAD-MS/MS, thermozeaxanthins.

INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenoides representam o grupo mais amplamente distribuído de pigmentos naturais na natureza, com mais de 700 compostos já identificados, e estão presentes em plantas superiores, micro-organismos e animais. Além de pigmentos, estes compostos possuem ações anticarcinogênicas, imunomoduladoras, preventivas das doenças cardiovasculares e da degeneração macular relacionada à idade, e alguns podem ser precursores de vitamina A (Krinsky, 1994; Mayne, 1996).

Os carotenoides são terpenoides com uma longa cadeia poliênica conjugada, a qual é responsável pela propriedade de absorção de luz e conseqüentemente pela cor, que varia de amarelo a vermelho. Um dos motivos da abundância de carotenoides na natureza está provavelmente associada ao fato de apresentarem uma via biossintética relativamente simples, fato já demonstrado em plantas, algas e também em fungos e bactérias (Kaiser et al., 2007).

A demanda global no mercado para carotenoides tem crescido em torno de 2,3 % ao ano e espera-se atingir \$919 milhões em 2015. No entanto, a principal fonte industrial de carotenoides é a síntese química (Gu et al., 2008), que apresenta várias desvantagens como a necessidade de desenvolvimento de novas rotas de síntese para cada novo carotenoide, a dificuldade na síntese de carotenoides mais complexos, a produção de misturas de esteroisômeros com produção de alguns isômeros não presentes na natureza, além da questão da poluição ambiental causada pelos resíduos gerados nestes processos.

Por outro lado, a produção de carotenoides por processos biológicos apresenta várias razões que tornam este tipo de abordagem muito atrativa, destacando-se a grande diversidade biológica para produção destes pigmentos, sendo que o conhecimento do processo metabólico de um carotenoide pode ser aplicado a outros carotenoides; a possibilidade de produção de compostos naturais estereo-específicos e de estrutura complexa; a capacidade metabólica de alguns micro-organismos, como algumas leveduras, de produzirem pigmentos a partir de substratos de baixo custo; e também, a possibilidade de utilizar ferramentas de biologia molecular para desenvolvimento de sistemas biológicos para produção de carotenoides. Durante os últimos anos, esforços têm sido direcionados no

desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenoides, com destaque para a produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* (Feofilova, 1994) e *Dunaliella* (Borowitzka e Borowitzka, 1989); e a produção de astaxantina por *Haematococcus sp* (Johnson e An, 1991) e *Phaffia rhodozyma* (Yamane et al., 1997; Parajó et al., 1998).

Desta forma, a biotecnologia microbiana tem um grande potencial de aplicações na indústria, medicina e meio ambiente. Estima-se que somente cerca de 5 % de moléculas bioativas presentes em micro-organismos foram caracterizadas, indicando que a extraordinária biodiversidade microbiana permanece praticamente intacta.

Muitos ambientes considerados extremos e hostis para permitir a sobrevivência e crescimento de organismos vivos são colonizados por micro-organismos que estão especificamente adaptados a estes nichos ecológicos, e que podem ser considerados uma fonte inestimável de recursos, não somente para a exploração de novos produtos biotecnológicos, mas também como modelos para investigar como determinadas biomoléculas são estabilizadas quando submetidas a condições extremas. Os ecossistemas extremos envolvem vulcões, gêiseres, profundidades marinhas, salinas, desertos, neves eternas, altas altitudes, lagos alcalinos, etc. (Rothschild e Mancinelli, 2001).

A adaptação de organismos a condições ambientais extremas obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para a sua sobrevivência. Devido às características “excêntricas” destes micro-organismos, seus componentes moleculares geralmente possuem propriedades que os tornam especialmente adequados para utilização em processos industriais. Neste contexto, é hoje reconhecido que estes micro-organismos constituem uma fonte preciosa de moléculas de interesse industrial e um excelente recurso para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas. Atualmente os micro-organismos extremófilos já estão sendo aplicados na biorremediação de solos com alta concentração de sal, na produção de extremoenzimas, biossensores, biopolímeros entre outros (Morozkina et al. 2010).

A temperatura, dentre os ambientes extremos, é o parâmetro que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção ou a

persistência de micro-organismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver (Gomes et al., 2007).

Os carotenoides de algumas bactérias termofílicas já foram estudados, sendo encontrados ésteres glicosídicos de carotenoides, chamados de termozeaxantinas e termocriptoxantinas, em *T. thermophilus* (Yokoyama et al., 1995; 1996); fitoeno, δ -caroteno, carotenoides polares com comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) 446 nm e carotenoides polares com $\lambda_{\text{máx}}$ de 452 nm em *T. aquaticus* (Ray et al., 1971); e carotenoides glicosídicos acilados em *Rhodothermus marinus* (Lutnaes et al., 2004).

A bactéria *Thermus filiformis* que foi objeto de estudo deste trabalho foi descoberta a mais de 20 anos. Entretanto, dentro de nosso conhecimento, a pouca bibliografia existente sobre ela tem como temática principal a genética destes micro-organismos, principalmente relacionada à expressão dos genes de suas enzimas termoestáveis. Até a presente data não foi encontrada nenhuma publicação que relatasse a composição de carotenoides produzidos por estas bactérias.

REFERÊNCIAS

- Borowitzka L. J. E. and Borowitzka M. A. B-Carotene Production With Algae. In Vandamme, J. E. (Ed). *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*, Elsevier Applied Science: New York, p. 15-26, 1989.
- Feofilova E. P. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 30: 143-153, 1994.
- Gomes E., Guez M. A. U., Martin N. and Silva R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, 30: 136-145, 2007.
- Gu Z., Chena D., Hana Y., Chena Z. and Gu F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT*, 41: 1082–1088, 2008.
- Johnson N. A. E. and An G. H. Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11: 297-326, 1991.
- Kaiser P., Surmann P., Vallentin G. and Fuhrmann H. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. *J Microbiol Meth* 70:142–149, 2007.
- Krinsky N. I. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66: 1003-1010, 1994.
- Lutnaes B. F., Strand A., Pétursdóttir S. K. and Liaaen-Jensen S. Carotenoids of thermophilic bacteria – *Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 455-468, 2004.
- Morozkina E. V., Slutskaya E. S., Fedorova T. V., Tugay T. I., Golubeva L. I., and Koroleva O. V. Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46: 1–14, 2010.
- Parajó J. C., Santos V. and Vazquez M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. *Process Biochemistry*, 33: 181-187, 1998.
- Ray P. H., White D. C. and Brock T. D. Effect of Growth Temperature on the Lipid Composition of *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 108:227-35, 1971.
- Rothschild L. J. and Mancinelli R. L. Life in extreme environments. *Nature*, 409: 1092-1101, 2001.
- Yamane Y., Higashida K., Nakashimada Y., Karizono T. and Nishio N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-cultures: kinetic and stoichiometric Analysis. *Applied Environmental and Microbiology*, 63: 4471-4478, 1997.
- Yokoyama A., Sandmann G., Hoshino T., Adachi K., Sakai M. and Shizuri Y. Thermozeaxanthins, new carotenoid-glicoside-esters from thermophilic Eubacterium *Thermus thermophilus*. *Tetrahedron Letters*, 36: 4901-4904, 1995.
- Yokoyama A., Shizuri Y., Hoshino T. and Sandmann G. Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Archives of Microbiology*, 165: 342-345, 1996.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar alguns parâmetros de cultivo que influenciam no crescimento celular e na produção de carotenoides da bactéria termófila *Thermus filiformis* ATCC 43280, e avaliar as propriedades antioxidantes do extrato rico em carotenoides.

Diante do exposto acima, o presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Separar e identificar os carotenoides de *Thermus filiformis* ATCC 43280 por HPLC-DAD-MS/MS,
- Verificar o crescimento de massa celular e produção de carotenoides da bactéria *Thermus filiformis* ATCC 43280,
- Avaliar o efeito da temperatura, pH, quantidade de triptona, extrato de levedura e elementos traços de Nitsch, e suas interações, por meio de planejamento estatístico fatorial, visando aumentar a produção de carotenoides ou direcionar para a síntese de um carotenoide específico,
- Determinar a atividade antirradical livre (ABTS), e capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio) dos extratos de carotenoides.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Micro-organismos extremos

Habitats terrestres aparentemente inóspitos, como é o caso dos desertos salinos da Etiópia, das calotas polares da Antártida, dos ambientes sulfurosos do sul de Itália, das emanções de lama negra superaquecida das fossas abissais do Pacífico e dos campos fortemente radioativos de Chernobyl, são colonizados por micro-organismos extremos que se adaptam muito bem à agressividade desses ambientes (Santos et al., 2001).

Nos últimos anos, os micro-organismos que vivem sob condições extremas têm sido foco da atenção dos pesquisadores. Esta grande atração dos cientistas está relacionada com os mecanismos de adaptação bioquímica dos micro-organismos em condições ambientais extremas, e também com o uso de enzimas produzidas por extremófilos em biotecnologia. Micro-organismos isolados de nichos ecológicos extremos estão bem adaptados a fatores ambientais desfavoráveis e têm potencial biotecnológico. A aplicação de substâncias biologicamente ativas, sintetizadas por extremófilos, na medicina, indústria de cosméticos e indústria de alimentos é promissora (Morozkina et al., 2010).

Os micro-organismos extremófilos podem ter aplicação na produção de enzimas com maior atividade e estabilidade e de substâncias biologicamente ativas. Além disso, alguns micro-organismos extremófilos têm a capacidade de destruição e/ou eliminação de xenobióticos (compostos químicos estranhos a um sistema biológico), como é o caso da acumulação de íons de metais pesados e de radionuclídeos (átomos com núcleos instáveis que emitem radiação) em rios e oceanos (Figura 1) (Podar e Reysenbach, 2006).

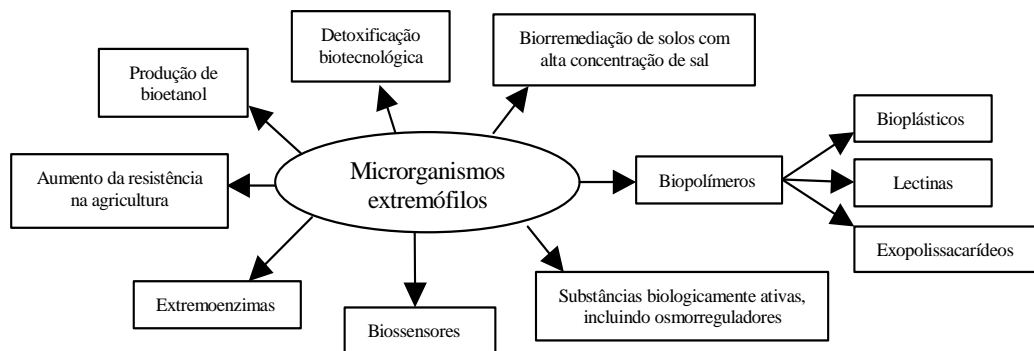


Figura 1: Possíveis aplicações de micro-organismos extremófilos na biotecnologia, medicina e indústria. Fonte: Morozkina et al. (2010).

A indústria de alimentos e a agricultura são as áreas mais promissoras para a aplicação de substâncias biologicamente ativas. A bactéria ácido-láctica *Tetragenococcus halophila*, que propicia a homofermentação sob alta concentração de NaCl (18,0%), é utilizada na produção de molho de soja (Roling e Van Verseveld, 1996). Além disso, representantes do gênero *Pseudomonas* são intensamente utilizados em processos de biodegradação (Margesin e Schinner, 2001). Bactérias isoladas na Antártica *Shewanella*, *Colwellia* e alguns outros gêneros são fontes potenciais de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (Nichols e Russell, 1999).

1.1 Micro-organismos termófilos

Uma das mais interessantes propriedades dos micro-organismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos. Dentre todos esses fatores, a temperatura é o parâmetro que mais influencia a função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção ou a persistência de micro-organismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver (Gomes et al., 2007).

Existem quatro formas distintas de ambientes termiais: aquecimento solar, processo de combustão, radioatividade e atividade geotérmica (fontes hidrotermais,

fumarolas, gêiseres, etc.), sendo este último o ambiente mais comum. A temperatura em vulcões ativos é muito elevada para organismos vivos, no entanto, fontes de água quente e fumaças associadas à atividade vulcânica possuem temperaturas mais razoáveis ao desenvolvimento de organismos termofílicos. A maior concentração de fontes de água quente é encontrada no parque nacional Yellowstone (Estados Unidos), Islândia, Nova Zelândia, Japão e antiga União Soviética (Brock, 1978). Na tabela 1 estão relatados alguns micro-organismos que crescem a altas temperaturas.

Tabela 1: Micro-organismos procarióticos que crescem em altas temperaturas.

Grupo	Micro-organismo	Temperatura Ótima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Referência
Cianobactéria	<i>Synechococcus lividus</i>	63-67	74	Meeks e Castenholz, (1971)
	<i>Synechocystis aquatilis</i>		45-50	Castenholz, (1969)
	<i>Pleurocapsa</i> sp.		52-54	Castenholz, (1969)
	<i>Spirulina</i> sp.		55-60	Castenholz, (1969)
	<i>Calothrix</i> sp.		52-54	Castenholz, (1969)
	<i>Chlorella</i> sp.	55	70-73	Bauld e Brock, (1973)
	<i>Chromatium</i> sp.		57-60	Castenholz, (1969)
Bactéria fotossintética	<i>Bacillus</i> YT-P	72	82	Heinen e Heinen, (1972)
	<i>B. stearothermophilus</i>	50-65	70-75	Gibson e Gordon, (1974)
	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>		74-76	Hollaus e Sleytr, (1972)
	<i>C. thermocellum</i>	60	68	Breed et al., (1957)
Bactérias ácido lácticas	<i>Streptococcus thermophilus</i>	40-45	50	Deibel e Seeley, (1974)
	<i>Lactobacillus thermophilus</i>	50-63	65	Gaughran, (1947)
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	46,5		Rogosa, (1974)
	<i>Streptomyces fragmentosporus</i>	50-60		Henssen (1974)
Actinomicetos	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	60	70	Küster, (1974)
	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	65-70	75	Zeikus e Wolfe, (1972)
Bactéria produtora de metano	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>		55	Fliermans e Brock, (1972)
Bactérias oxidantes de enxofre	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	70-75	85-90	Mosser et al., (1973)
	<i>Desulfovibrio thermophilus</i>	65	85	Rozanova e Khudyakova, (1974)
Bactérias redutoras de sulfato	<i>Methylococcus capsulatus</i>	30-50	55	Leadbetter, (1974)
Bactérias oxidantes de metano	<i>Thermomicrobium roseum</i>	70-75	85	Jackson et al., (1973)
	<i>Thermus aquaticus</i>	70	79	Brock e Freeze, (1969)
Gram-negativas aeróbias	<i>T. flavus</i>	70-75	80	Rozanova e Khudyakova, (1974)
	<i>T. thermophilus</i>	70	85	Oshima e Imahori, (1974)
	<i>T. ruber</i>	60	80	Loginova e Egorova, (1975)
	<i>Thermus</i> X-1	69-71		Ramaley e Hixson, (1970)

Fonte: adaptado de Brock (1978).

1.2 Micro-organismos do gênero *Thermus* sp.

Quando se iniciaram os estudos com micro-organismos de fontes termais nos anos 60, os cientistas acreditavam que a vida de bactérias termofílicas podia ser mantida a temperaturas em torno de 55 °C. No entanto, logo foi descoberto que muitas bactérias de fontes termais cresciam em temperaturas ainda mais altas (~ 75 °C). Em 1969, Thomas Brock e Hudson Freeze da Universidade de Indiana (EUA) descreveram uma nova espécie de bactéria termofílica, nomeada *Thermus aquaticus* (Brock e Freeze 1969). Esta foi a primeira bactéria do gênero *Thermus* descoberta em fontes termais.

As bactérias do gênero *Thermus* pertencem à família Thermaceae, são bastonetes Gram negativos, aeróbias e catalase positiva (Huber et al., 2004). Em geral, as bactérias *Thermus* apresentam crescimento ótimo entre 70°C e 75°C, no entanto algumas espécies apresentam temperaturas de crescimento mais baixas, ao redor de 60°C. A faixa ótima de pH para crescimento dessas bactérias é entre 7,5 e 8,0, podendo crescer em valores de pH mais baixo (~ 5,1) ou mais elevado (~ 9,5) (Huber e Stetter, 2004). Segundo Brock e Freeze (1969), as bactérias do gênero *Thermus* podem utilizar aminoácidos ou sais de amônia como fonte de nitrogênio, e açúcares e ácidos orgânicos como fontes de carbono. Diferentemente de outras bactérias Gram negativas, a membrana externa das espécies do gênero *Thermus* não é composta somente de lipopolissacarídeos, mas sim de glicolipídeos, cuja estrutura parece estar estritamente envolvida à sua adaptação em altas temperaturas (Leone et al., 2006).

De acordo com Euzéby (1997) existem 12 espécies diferentes pertencentes ao gênero *Thermus*: *T. aquaticus*, *T. antranikianii*, *T. brockianus*, *T. chliarophilus*, *T. filiformis*, *T. igniterrae*, *T. oshimai*, *T. profundus*, *T. ruber*, *T. scotoductus*, *T. silvanus*, e *T. thermophilus*.

Na tabela 2 são apresentadas algumas das principais características dessas bactérias do gênero *Thermus*.

Tabela 2: Características de diferentes espécies de *Thermus*.

Espécie	Cor do pigmento	Temperatura	pH	Nutrição	Relação com oxigênio	Local de onde foi isolada	Descobridor (Ano)
<i>Thermus aquaticus</i>	Amarelo	40-79 °C	6,0-9,5	Fontes de nitrogênio, açúcares e ácidos orgânicos. Cresce melhor em meio complexo com 0,1 a 0,3% de triptona e extrato de levedura. Não reduz nitrato. Meio mínimo suplementado com	aeróbia	Parque nacional de Yellowstone nos EUA	Brock e Freeze (1969)
<i>Thermus ruber</i>	Vermelho claro	35-70 °C	6,5-7,3	peptona como fonte de nitrogênio, extrato de levedura e uma fonte de carbono.	aeróbia	Fontes termais da península de Kamchatka na Rússia	Loginova e Egorova (1975)
<i>Thermus filiformis</i>	Amarelo	37-80 °C	6,0-8,6	Carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos como fonte de carbono. Não reduz nitrato.	aeróbia	Fontes termais da Nova Zelândia	Hudson et al. (1987)
<i>Thermus igniterrae</i>	Amarelo	45-80 °C	7,5-8,5	Fonte de nitrogênio, extrato de levedura e fonte de carbono. Reduz nitrato	aeróbia	Fontes termais de Reykyafloot na Islândia	Chung et al. (2000)
<i>Thermus antranikianii</i>	Amarelo	50-80 °C	7,5-8,5	Fonte de nitrogênio, extrato de levedura e fonte de carbono. Reduz nitrato	aeróbia	Fontes termais de Hruni na Islândia	Chung et al. (2000)

Fonte: adaptado de Chung *et al.* (2000).

A bactéria *Thermus filiformis* foi isolada em 1987 de uma fonte termal da Nova Zelândia e pela primeira vez descrita por Hudson et al. (1987). Esta bactéria sintetiza intracelularmente carotenoides amarelos em tricomas espirais de 0,5 a 1,7 μm e de comprimento indeterminado e variável (muitas centenas de micrômetros) contendo proporção relativamente grande de ácidos graxos anteiso. No entanto, outras cepas da Nova

Zelândia designadas a esta espécie baseadas nos valores de reassociação DNA-DNA, não são filamentosas e contém grande proporção de ácidos graxos iso (Chung et al. 2000).

A *T. filiformis* é uma bactéria Gram negativa, aminopeptidase negativa, heterofílica utilizando como fonte de carbono carboidratos, ácidos orgânicos, e aminoácidos. Diferentemente de *T. aquaticus* e *T. ruber*, a *T. filiformis* é não-proteolítica e produz α -galactosidade. É um micro-organismo aeróbio obrigatório, e é suscetível a antibióticos β -lactâmicos (Hudson et al., 1987).

Embora a bactéria *T. filiformis* tenha sido descoberta a mais de 20 anos, a pouca bibliografia existente sobre ela tem como temática principal a genética destes micro-organismos, principalmente relacionada aos genes de expressão de suas enzimas termoestáveis.

2. Estrutura química, propriedades e funções de carotenoides

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

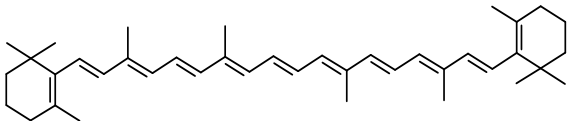
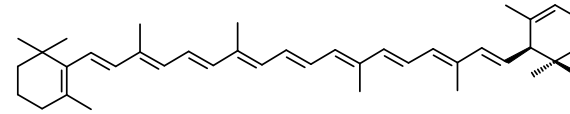
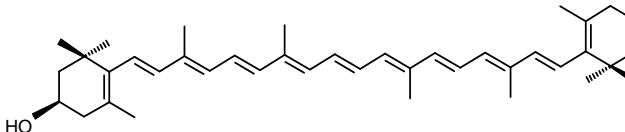
Fatores como calor, luz e ácidos catalisam a isomerização dos carotenoides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor e da atividade pró-vitáminica. Portanto, vários cuidados devem ser tomados durante a extração de carotenoides, tais como proteção contra a luz, análise em curto espaço de tempo, uso de atmosfera inerte, uso de baixa temperatura e adição de antioxidante.

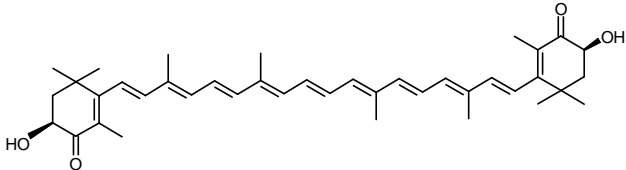
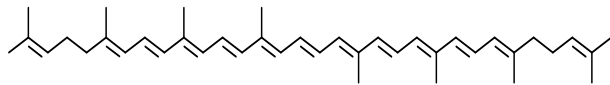
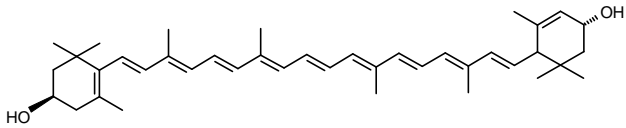
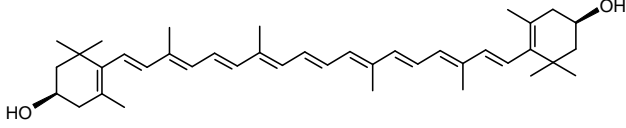
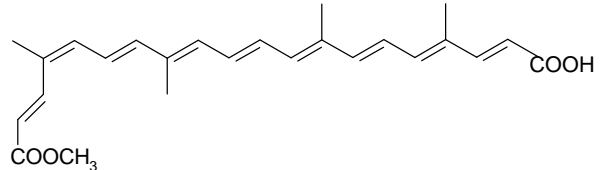
Os carotenoides apresentam na sua cadeia uma alternância de ligações duplas e simples que geram um sistema de elétrons π que se desloca sobre toda a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias alta reatividade química e absorção de luz na região do

visível. Como consequência, os carotenoides podem facilmente sofrer isomerização e oxidação. Por outro lado, a cadeia poliênica é responsável pela desativação de radicais livres e de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), espécies altamente reativas responsáveis pela iniciação de cadeias de oxidação nas células, causando danos tais como destruição de DNA e peroxidação lipídica (Caris-Veyrat, 2007).

Nas indústrias de alimentos os carotenoides são usados como corantes para colorir os alimentos incolores, realçar e uniformizar a cor de alguns produtos alimentícios e repor a cor dos alimentos durante o processamento e armazenamento. Também são utilizados como aditivos em rações para aquicultura com o objetivo de promover a pigmentação adequada de alguns animais, como exemplo, o uso de astaxantina na ração de salmão e de camarão (Aksu e Eren, 2007) e, o uso de luteína e zeaxantina na pigmentação de gema de ovos de galinha (Alcântara e Sanchez, 1999). Além disso, alguns carotenoides são adicionados aos alimentos devido à sua atividade pró-vitâmica A. A exigência para um carotenoide possuir esta atividade é apresentar um anel- β não substituído, com uma cadeia poliênica de no mínimo 11 carbonos. Exemplos de carotenoides com atividade pró-vitâmica A são: β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina. A tabela 3 apresenta alguns carotenoides empregados na indústria de alimentos.

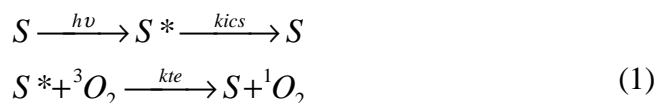
Tabela 3: Aplicação de carotenoides na indústria de alimentos.

Carotenoide	Aplicação/ propriedade	Estrutura
β -caroteno	Corante para alimentos, atividade de pró-vitamina A	
α -caroteno	Corante para alimentos, atividade de pró-vitamina A	
β -criptoxantina	Atividade de pró-vitamina A	

astaxantina	Ração para peixes	
licopeno	Corante para alimentos, atividade antioxidante	
luteína	Ração para aves e corante para alimentos, prevenção da degeneração macular relacionada a idade	
zeaxantina	Ração para aves	
bixina	Corante para alimentos	

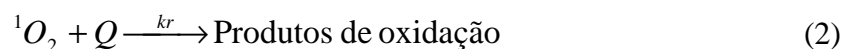
Além da função corante, os carotenoides podem apresentar atividade antioxidante frente ao oxigênio singlete (1O_2) e radicais livres, propriedade diretamente relacionada com a estrutura do carotenoide (Rice-Evans et al., 1997).

O 1O_2 pode ser gerado de diversas formas, seja por processos físicos, químicos e fotoquímicos. Um destes processos, chamado de fotossensibilização, pode ocorrer intracelularmente ou em uma solução através de um mecanismo de transferência de energia a partir do estado eletrônico triplete excitado de uma molécula orgânica ou inorgânica, conhecida como sensibilizador (S), para o oxigênio molecular no estado eletrônico fundamental triplete (3O_2). Este mecanismo é conhecido como oxidação tipo II (equação 1).



Outro mecanismo conhecido como tipo I consiste na formação de radicais livres, através da desativação do sensibilizador no estado triplete excitado pela associação direta com outra molécula, como por exemplo, os carotenóides. Em sistemas biológicos, moléculas como clorofilas, riboflavina e porfirinas absorvem luz na região do visível e atuam como sensibilizadores para produção de 1O_2 e radicais livres. Alguns corantes artificiais, como azul de metileno e rosa de bengala, também podem atuar como sensibilizadores.

Na presença de um antioxidante (Q), o 1O_2 gerado pode ser desativado via processo químico, com formação de produtos de oxidação (equação 2), ou mediante um processo físico de desativação com liberação de energia na forma de calor (equação 3) (Di Mascio et al., 1989). Os carotenoides também atuam como desativadores de radicais livres.



Os testes para medir a atividade antirradical livre podem ser divididos em dois grupos: métodos diretos que avaliam a peroxidação lipídica no qual se usa um substrato (lipídio, lipoproteína) e mede-se o grau de inibição da oxidação e, os métodos indiretos que medem a habilidade de aprisionar ou desativar radicais livres. Os procedimentos indiretos empregados na avaliação da capacidade antirradical livre de compostos puros e de extratos complexos estão baseados na medida do consumo de radicais livres estáveis quando adiciona-se um agente antioxidante à solução. Assim, o decréscimo da concentração do radical livre está relacionado com a habilidade do composto adicionado de capturar radicais livres (Prior et al., 2005; Roginsky e Lissi, 2005).

O radical $ABTS^{\bullet+}$ (2,2' azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) vem sendo muito utilizado na análise indireta da atividade antirradical livre por apresentar algumas vantagens como rapidez, estabilidade e facilidade de manuseio (Prior et al., 2005; Roginsky e Lissi, 2005). Este método é considerado um método indireto, pois o valor da capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) caracteriza a capacidade da amostra avaliada em reagir com o radical $ABTS^{\bullet+}$ e não de inibir o processo oxidativo diretamente (Roginsky e Lissi, 2005).

3. Composição de carotenoides em alguns micro-organismos extremófilos

Em estudos anteriores realizados com micro-organismos extremófilos verificou-se a presença de carotenoides com estruturas especiais e diferentes das usualmente encontradas em alimentos (cadeia carbônica de 40 carbonos e máximo de 11 ligações duplas conjugadas) (Britton et al., 2004).

Lutnaes et al. (2004) identificaram carotenoides glicosídicos acilados produzidos pela bactéria termofílica halófila *Rhodothermus marinus*. Burgess et al. (1999) identificaram como principal componente de *Meiothermus ruber* o carotenoide 1'-β-glucopiranosil-3,4,3',4'-tetradeidro-1',2'-diidro-β,ψ-caroten-2-ona (Figura 2).

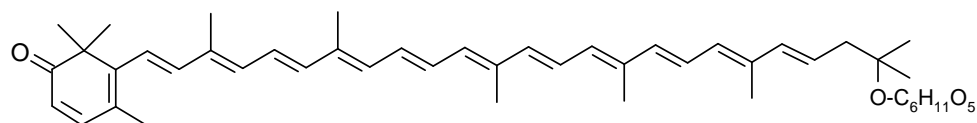


Figura 2: Estrutura do principal carotenoide de *M. ruber*.

A composição completa dos carotenoides da bactéria termofílica de água termal sulfurada *Chlorobium tepidum* cepa TNO foi determinada por Takaichi et al. (1997), e os principais carotenoides encontrados foram: γ-caroteno, clorobacteno, e seus derivados 1',2'-diidro (1',2'-diidro-γ-caroteno e 1',2'-diidroclorobacteno), Figura 3. Em menores quantidades foram encontrados OH-γ-caroteno, OH-clorobacteno e seus ésteres de ácidos graxos glicosilados.

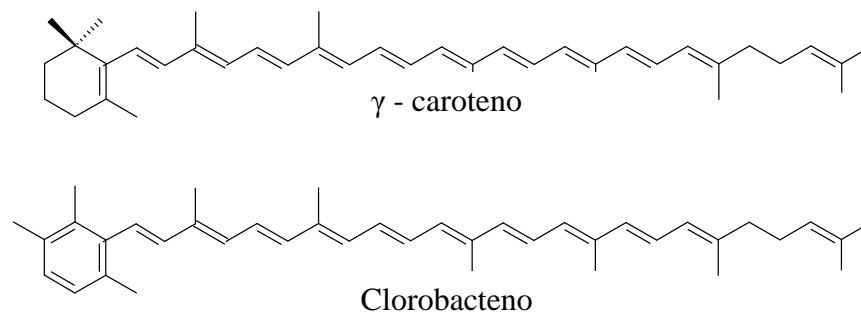


Figura 3: Principais carotenoides de *Chlorobium tepidum* cepa TNO.

Em bactérias halófilas como *Halobacterium salinarium* e *Haloferax volcanii* foram identificados carotenoides de cadeia longa com 50 carbonos, tais como, all-*trans*-bacterioruberina, monoanidrobacterioruberina, bisanidrobacterioruberina, trisanidrobacterioruberina e tetraanidrobacterioruberina, Figura 4 (Kelly et al., 1970; Kushwaha et al., 1974; Ronnekleiv e Liaaen-Jensen, 1992; Ronnekleiv & Liaaen-Jensen, 1995).

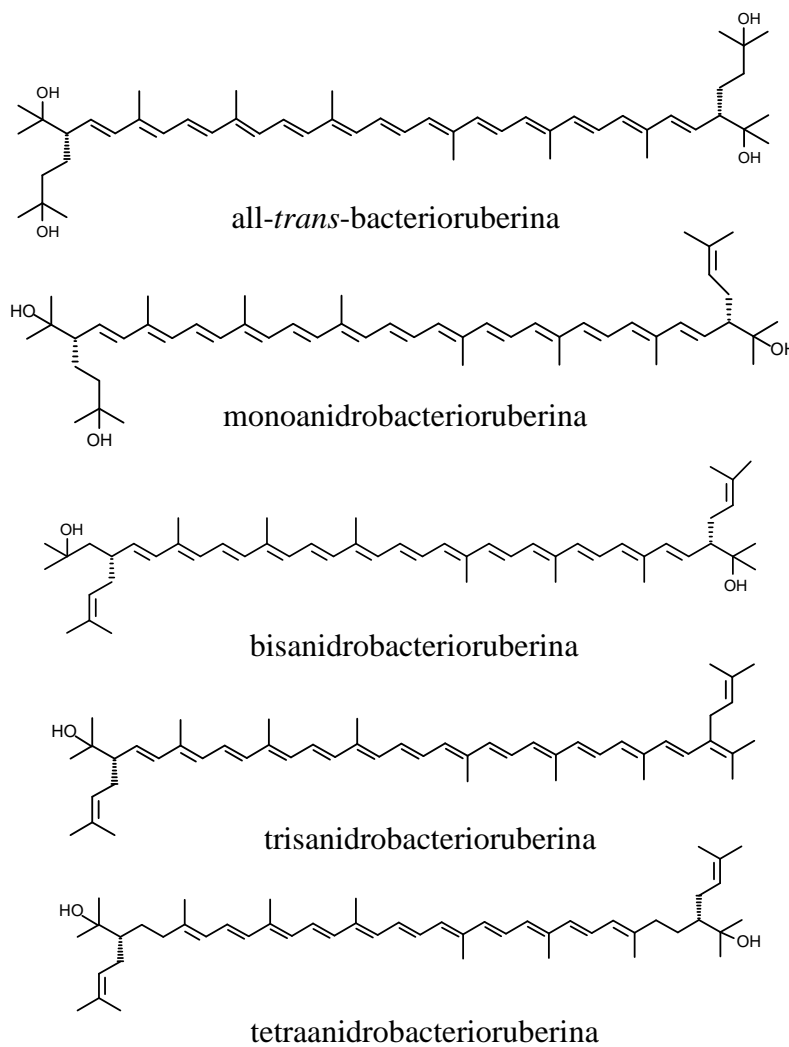


Figura 4: Carotenoides de *Halobacterium salinarium* e *Haloferax volcanii*.

Nos micro-organismos alcalofílicos *Heliorestis daurensis* e *H. baculata* foram identificados como principais carotenoides: 4,4'-diaponeurosporeno e éster glicosídico de OH-diaponeurosporeno, Figura 5 (Takaichi et al., 2003).

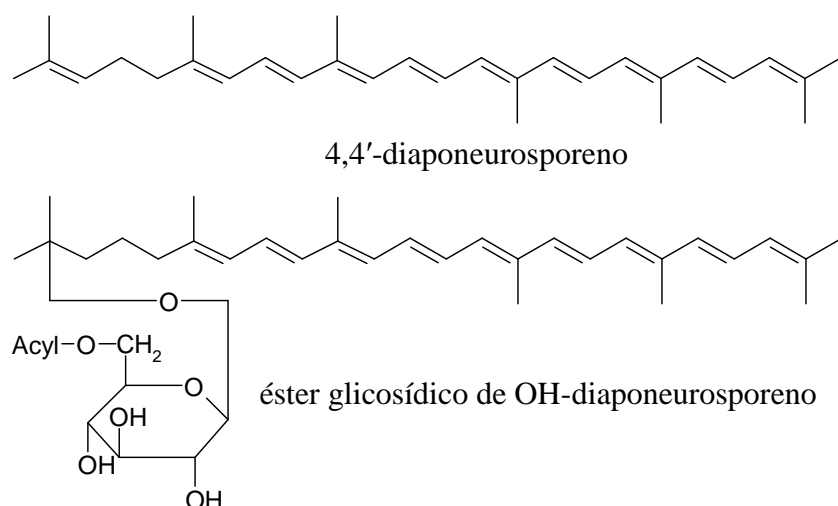


Figura 5: Carotenoides majoritários de *Heliorestis daurensis* e *H. baculata*.

Estudos com a bactéria *Thermus aquaticus* revelaram a presença de carotenoides, principalmente polares, mantendo aproximadamente a proporção de 8% de fitoeno, 7% de (6*R*) δ -caroteno, 50% de carotenoides polares com comprimento de onda de 446 nm e 25% de carotenoides polares com comprimento de onda de 452 nm (Ray et al., 1971). No entanto, esses carotenoides polares não foram identificados.

Em *Thermus thermophilus* foram encontrados ésteres glicosídicos de carotenoides, chamados de termozeaxantinas e termocriptoxantinas (Yokoyama et al., 1995; 1996), Figura 6.

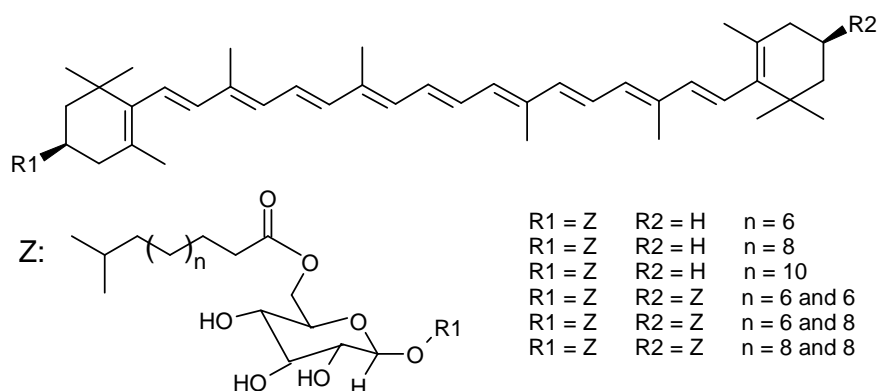


Figura 6: Estrutura das termocriptoxantinas (R1 = Z e R2 = H) e das termozeaxantinas (R1 = R2 = Z) isoladas de *Thermus thermophilus*.

4. Variáveis envolvidas no processo de produção de carotenoides por micro-organismos

Fatores nutricionais e físicos, tais como natureza e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, minerais, pH, aeração, temperatura e luz possuem uma forte influência no crescimento celular, composição e produção de carotenoides por micro-organismos.

Melhorar a eficiência da biossíntese de carotenoides significa aumentar a produção. Juntamente com as condições de cultivo, a biossíntese de carotenoides é conduzida pelo nível e atividade das enzimas biossintéticas. Assim, uma alta produção pode ser alcançada alterando-se o nível e a atividade destas enzimas ou a via biossintética, com o emprego de melhoramento genético (Bhosale, 2004).

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

Estudos da composição lipídica da bactéria *Thermus aquaticus* YT-1, demonstraram que os carotenoides responsáveis pela pigmentação amarela representam cerca de 60 % da membrana lipídica e em sua maioria são muito polares, difíceis de purificar e caracterizar. O aumento progressivo da temperatura de crescimento desta bactéria, de 50 °C para 75 °C, leva a um aumento na quantidade de lipídios totais, sendo que os fosfolipídeos aumentam cerca de duas vezes, carotenoides cerca de 1,8 vezes, e glicolipídeos cerca de quatro vezes (Brock, 1978).

Borowitzka et al. (1990) estudaram o efeito de diferentes concentrações de NaCl no acúmulo de carotenoides por *Dunaliella salina* e observaram que a porcentagem de luteína, em relação ao total de carotenoides, diminui e a de zeaxantina aumenta quando este micro-organismo é cultivado em concentrações de 10 e 20 % de NaCl.

Em relação aos carotenoides produzidos por bactérias halófilas, Asker e Ohta (1999) observaram que o aumento da concentração de oxigênio dissolvido e a adição de elementos traços (FeCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ao meio de cultivo favoreceram a produção destes pigmentos.

Latha et al. (2005) em estudo com a levedura *Rhodotorula glutinis* demonstraram que estes micro-organismos eram capazes de produzir carotenoides em uma ampla faixa de pH de 2,5 a 9,5 (ótimo em 5,5) e em temperaturas de 29 a 32 °C. Além disso, concluíram que a luz não foi fator limitante no crescimento e na produção de pigmentos e que o máximo crescimento e pigmentação foram atingidos utilizando-se nitrato de sódio, como fonte de nitrogênio e glicose e frutose como fontes de carbono.

Squina et al. (2002) demonstraram, através de um planejamento experimental fatorial fracionado, que o caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono é adequado para o crescimento de leveduras do gênero *Rhodotorula*, e que a ausência ou presença de peptona e soluções de sais inorgânicos no meio de cultura, não proporcionam uma produção seletiva de algum carotenóide em particular.

A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides. O uso de glicose levou a maiores rendimentos na produção de carotenoides (1000 $\mu\text{g/g}$) por *Rhodotorula* sp. (Buzzini e Martini, 1999). Porém, na produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (Sutherland et al, 1996), verificou-se que

concentrações altas de glicose inibiram a carotenogênese, enquanto que a sacarose, maltose e celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados. Um aumento na produção de β -caroteno foi observado no cultivo de *P. rhodozyma* em meio com 5 % de glicose quando comparado a meios com teores menores que este.

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de metabólitos. Para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* (Razavi e Marc, 2006), o pH inicial apresentou um efeito sobre o conteúdo de carotenoides e de biomassa. No cultivo a pH 3,5, os conteúdos de carotenoides (2,02 mg/g) e de células (6,81 g/L) observados foram mínimos. A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH de 3,5 para 6,0, sendo pH 6,0 ótimo para o crescimento celular (11,3 g/L) e formação de pigmento (3,43 mg/g).

5. Referências

- Alcântara S. and Sanchez S. Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 697-700, 1999.
- Asker D. and Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88: 617-621, 1999.
- Bauld J. and Brock T. D. The adaptation of heterotrophic microcosms to different temperatures. *Ecology*, 49: 343-346, 1973.
- Borowitzka M. A., Borowitzka L. J. and Kessly D. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 2: 111-119, 1990.
- Bhosale P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 351-361, 2004.
- Breed R. S., Murray E. G. D. and Simth N. R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1957.
- Britton G. Overview of Carotenoid Biosynthesis. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Carotenoids serie, vol. 3: *Biosynthesis*. Birkhäuser, Basel, p.13-147, 1998.
- Britton G., Liaaen-Jensen S. And Pfander H. *Carotenoids Handbook*; Birkhauser: Basel, Switzerland, 2004.
- Brock T. D. and Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non- sporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98: 289-297, 1969.
- Brock T. D. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures* New York: Springer-Verlag, 1978, 465 p.

-
- Burguess M. L., Barrow K. D., Gao C., Heard G. M. and Glenn D. Carotenoid glycoside esters from thermophilic bacterium *Meiothermus rubber*. *Journal of Natural Products*, 62: 859-863, 1999.
- Buzzini P. and Martini A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, 71: 41-44, 1999.
- Caris-Veyrat C. *Antioxidant and prooxidant actions and stabilities of carotenoids in vitro and in vivo and carotenoid oxidation products*. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu (Ed.). CRC, New York, p.177-192, 2007.
- Castenholz R. W. The thermophilic cyanophytes of Iceland and the upper temperature limit. *Journal of Phycology*, 5: 360-368, 1969.
- Chung A. P., Rainey F. A. and Valente M. *Thermus igniterrae* sp. Nov. and *Thermus antranikianii* sp. Nov., two new species from Iceland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 209-217, 2000.
- Deibel R. H. and Seeley H. W., Jr. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 8ed., Buchanan R. E. and Gibbons N. E., eds. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 490-509, 1974.
- Di Mascio P., Kaiser S. and Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274: 532-538, 1989.
- Euzéby J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 1997, 47, 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Last full update: December 06, 2008. URL: <http://www.bacterio.net>).
- Fliermans C. B. and Brock T. D. Ecology of sulfur-oxidizing bacteria in hot acid soils. *Journal of Bacteriology*, 111: 343-350, 1972.
- Gaughran E. R. L. The thermophilic microorganisms. *Bacteriology Reviews*, 11: 189-225, 1947.
- Gibson T. and Gordon R. E. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8ed., Buchanan R. E. and Gibbons N. E., eds. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 529-550, 1974.
- Gomes E., Guez M. A. U., Martin N. and Silva R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, 30: 136-145, 2007.
- Heinen U. J. and Heinen W. Characteristics and properties of a caldo-active bacterium producing extracellular enzymes and two related strains. *Archives of Microbiology*, 82: 1-23, 1972.
- Henssen A. *Streptomyces fragmentosporus*, ein neuer thermophiler Actinomycet. *Archives of Microbiology*, 67: 21-27, 1974.
- Hollaus F. and Sleytr U. On the taxonomy and fine structure of some hyperthermophilic saccharolytic clostridia. *Archives of Microbiology*, 86: 129-146, 1972.
- Huber R. and Stetter K. O. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York: Springer-Verlag; 2004.
- Hudson J. A., Morgan H. W. and Daniel R. M. *Thermus filiformis* sp. Nov., a filamentous caldoactive bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 431-436, 1987.

- Jackson T. J., Ramaley R. F. and Meinschein W. G. *Thermimicrobium*, a new genus of extremely thermophilic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23: 28-36, 1973.
- Kelly M., Norgard S. and Liaaen-Jensen S. Bacterial carotenoids XXXI.* C50-Carotenoids 5.* Carotenoids of *Halobacterium salinarum*, especially bacterioruberin. *Acta Chemica Scandinavica*, 24: 2169-2182, 1970.
- Kushwaha S. C., Gochner M. B., Kushner D. J. and Kates M. Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 241-245, 1974.
- Küster E. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 8ed., Buchanan R. E. and Gibbons N. E., eds. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 858-859, 1974.
- Latha B. V., Jeevaratnam K., Murali H. S. and Manja K. S. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 353-357, 2005.
- Leadbetter E. R. In *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 8ed., Buchanan R. E. and Gibbons N. E., eds. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 267-269, 1974.
- Leone S, Molinaro A, Lindner B, Romano I, Nicolaus B, Parrilli M, Lanzetta R, Holst O. The structures of glycolipids isolated from the highly thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* Samu-SA1. *Glycobiology*, 16: 766-775, 2006.
- Loginova L. G. and Egorova L. A. Obligatno-termofil'nye bakterii *Thermus ruber* v gidrotermakh kamchatki. *Mikrobiologiya*, 44:661-665, 1975.
- Lutnaes B. F., Strand G., Pétursdóttir S. K. and Liaaen-Jensen S. Carotenoids of thermophilic bacteria – *Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 455-468, 2004.
- Margesin, R. and Schinner, F., Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 650-663, 2001.
- Mayne S. T., 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB Journal*, 10: 690-701.
- Meeks J. C. and Castenholz R. W. Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Archives of Microbiology*, 78: 25-41, 1971.
- Morozkina E. V., Slutskaya E. S., Fedorova T. V., Tugay T. I., Golubeva L. I., and Koroleva O. V. Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review) *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46: 1-14, 2010.
- Mosser J. L., Mosser A. G. and Brock T. D. Bacterial origin of sulfuric acid in geothermal habitats. *Science*, 179: 1323-1324, 1973.
- Nichols D.S. and Russell N.J. Polyunsaturated fatty acids in the bacteria - a dogma rewritten. *Archives of Microbiology*, 145: 767-779, 1999.
- Oshima T. and Imahori K. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. Nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24: 102-112, 1974.

-
- Podar M. and Reysenbach A.L. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17: 250–255, 2006.
- Prior R. L., Wu X. and Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302, 2005.
- Ramaley R. F. and Hixson J. Isolation of nonpigmented, thermophilic bacterium similar to *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 103: 527-582, 1970.
- Ray, P. H.; White, D. C.; Brock, T. D. Effect of growth temperature on the lipid composition of *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 108: 227-35, 1971.
- Razavi S. H. and March I. Effect of Temperature and pH on the Growth Kinetics and Carotenoid Production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 Using Technical Glycerol as Carbon Source. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering*, 23: 59-64, 2006.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159, 1997.
- Roginsky V. and Lissi E. A. Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254, 2005.
- Rogosa M. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8ed., Buchanan R. E. and Gibbons N. E., eds. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 669-676, 1974.
- Roling W. F. M. and van Verseveld H.W. Characterization of *Tetragenococcus halophilal* populations in Indonesian Soy Mash (Kecap) Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1203–1207, 1996.
- Ronnekleiv M. and Liaaen-Jensen S. Bacterial carotenoids 53*, C50-carotenoids 23; carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 627-734, 1995.
- Ronnekleiv M. and Liaaen-Jensen S. Bacterial carotenoids. 52* C50-carotenoids 22. naturally occurring geometrical isomers of bacterioruberin. *Acta Chemica Scandinavica*, 46: 1092-1095, 1992.
- Rozanova E. P. and Khudyakova A. I. Novji bessporovji termofil'nyi organizm, vostablivayushchii sut'faty, *Desulfovibrio thermophilus* nov. sp. *Mikrobiologiya*, 43: 1069-1075, 1974.
- Santos H., Lamosa P. and Costa M. S. Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. *Boletim de biotecnologia: Biotecnologia Microbiana*, 69: 2-10, 2001.
- Squina F. M., Yamashita F., Pereira J. L., Mercadante A. Z. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis* in culture médium supplemented with sugar cane juice. *Food Biotechnology*, 16, 227-235, 2002.
- Sutherland F. C. W., Kilian A. G., Meyer P. S. and Preez, J. C. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters*, 18: 975-980, 1996.
- Takaichi S., Oh-oka H., Maoka T., Jung D. O. and Madigan M. T. Novel carotenoid glucoside esters from alkaliphilic heliobacteria. *Archives of Microbiology*, 179: 95–100, 2003.

-
- Takaichi S., Wang Z. Y., Umetsu M., Nozawa T., Shimada K. and Madigan M. T. New carotenoids from the thermophilic green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*: 1',2'-dihydro- γ -carotene, 1',2'-dihydrochlorobactene, and OH-chlorobactene glucoside ester, and the carotenoid composition of different strains. *Archives of Microbiology*, 168: 270–276, 1997.
- Villen R. A. Aspectos econômicos. In: *Biotecnologia Industrial*. Schmidell W., Lima U. A., Aquarone E. and Borzani W. (Eds). São Paulo, 2001, p. 523-541.
- Yokoyama A., Sandmann G., Hoshino T., Adachi K., Sakai M. and Shizuri Y. Thermozeaxanthins, new carotenoid-glicoside-esters from thermophilic Eubacterium *Thermus thermophilus*. *Tetrahedron Letters*, 36: 4901-4904, 1995.
- Yokoyama A., Shizuri Y., Hoshino T. and Sandmann G. Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Archives of Microbiology*, 165: 342-345, 1996.
- Zeikus J. G. and Wolfe R. S. *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. N., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 109: 707-713, 1972.

CAPÍTULO II

Composição e capacidade antioxidante do extrato de carotenoides produzido por bactéria termófila

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista

LWT- Food Science and Technology

RESUMO

Considerando que os micro-organismos extremófilos são importantes fontes de compostos bioativos e que algumas bactérias termófilas produzem carotenoides com características estruturais diferentes das encontradas nos alimentos, o objetivo deste estudo foi: identificar os carotenoides produzidos pela bactéria *Thermus filiformis* (ATCC 43280), através de cromatografia líquida de alta eficiência conectada aos detectores de arranjo de diodos e de massas (HPLC-DAD-MS/MS), e avaliar a capacidade antioxidante dos seus extratos ricos em carotenoides na desativação do radical ABTS^{•+} e do peróxido de hidrogênio. Foram identificados os carotenoides zeaxantina (14,4 %), zeaxantina monoglicosilada (4,7 %), zeaxantina monoglicosilada esterificada com ácidos graxos saturados ramificados, com cadeia de cadeia de 11 (2,3 %), 12 (5,2 %), 13 (25,4 %), 14 (9,0 %) e 15 (35,3 %) carbonos e derivados dos carotenoides termozeaxantina-13 (0,8 %) e termozeaxantina-15 (2,8 %). O extrato rico em carotenoides da bactéria *Thermus filiformis* apresentou capacidade de desativação do radical ABTS^{•+} com valor de TEAC de 2,87 e capacidade de desativação do peróxido de hidrogênio com IC₅₀ de 4,24 µM.

Palavras chave bactéria termófila, carotenoides, *Thermus filiformis*, termozeaxantina, atividade antioxidante, HPLC-DAD-MS/MS

INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos terpenoides de grande interesse em vários campos da ciência devido às suas propriedades e funções diversificadas. Evidências epidemiológicas e resultados experimentais sugerem que os carotenoides provenientes da dieta reduzem o risco do aparecimento de muitas doenças, tais como arteriosclerose, catarata, degeneração macular relacionada com a idade e câncer (Peto et al. 1981; Greenberg et al. 1990; Stahl e Sies 1996; Henneckens 1997; Moeller et al. 2000). Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, mas de maneira geral, a redução do risco dessas doenças envolve a redução ou inibição de reações de oxidação, em outras palavras, a prevenção do estresse oxidativo resultante de um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade de defesa antioxidante das células.

Os micro-organismos acumulam vários tipos de carotenoides como parte da resposta ao estresse. Foi demonstrado, em pesquisas anteriores, que os carotenoides protegem tanto bactérias fotossintéticas quanto as não fotossintéticas contra a foto-oxidação letal (Mathews, 1966).

A espécie *Thermus filiformis* é uma bactéria termófila, pertencente à família Thermaceae, Gram negativa, não esporulada, aeróbia, catalase e oxidase positiva (Huber e Stetter, 2004). Esta bactéria foi isolada pela primeira vez em 1987 em uma fonte termal da Nova Zelândia (Hudson et al., 1987). A bactéria *T. filiformis* produz carotenoides amarelos, baixos níveis de ácidos graxos ramificados da série iso e altos níveis de ácidos graxos ramificados da série anteiso, fato este que difere a *T. filiformis* das demais espécies de *Thermus* (Chung et al., 2000).

Estudos anteriores relataram a presença dos carotenoides termozeaxantinas, termobiszeaxantinas e termocriptoxantinas em bactérias do gênero *Thermus* (Yokoyama et al., 1995; Yokoyama et al., 1996). Entretanto, os carotenoides de *T. filiformis* ainda não foram identificados.

O presente trabalho teve como objetivos separar e identificar os carotenoides da bactéria *Thermus filiformis*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência conectada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS/MS), e avaliar a capacidade antioxidante do extrato rico em carotenoides na desativação do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e condições de cultivo

Foi utilizada a linhagem *Thermus filiformis* (ATCC 43280), doada pelo Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. O micro-organismo foi reativado em meio líquido Castenholz TYE 1 % a 70 °C por 24-48 horas (Ramaley and Hixson, 1970). A cultura foi estocada em duplicata em freezer a -70 °C com glicerol.

O cultivo das bactérias foi realizado em três fases consecutivas. Na primeira fase, a bactéria termófila foi cultivada em meio Castenholz TYE 1 % (pH 7,5) sob incubação a 70 °C durante 24 horas. Na segunda fase (pré-inóculo) foram transferidas duas alçadas de cultura da placa para frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo o meio de cultura Castenholz TYE 1 %, e o micro-organismo foi incubado a 70 °C, 230 rpm por 48 horas. O pré-inóculo atingiu uma população de 10⁹ células/mL. Na terceira fase foi realizado o preparo do inóculo em Erlenmeyers de 1000 mL, contendo 10 % (v/v) de pré-inóculo, com as mesmas condições de cultivo utilizadas no pré-inóculo.

Após o crescimento bacteriano nas condições descritas acima, a suspensão de células foi centrifugada a 23900 x g por 10 min a 10 °C e o sobrenadante descartado. A massa celular foi lavada com água destilada, seguido de centrifugação. O pellet obtido foi congelado em placas a -35 °C e liofilizado (Liotop modelo K105, Brasil).

Padrões e Reagentes

Para as análises os reagentes utilizados foram: [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico)] (ABTS), persulfato de potássio, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), azul de metileno (MB), lucigenina (9,9'-Bis(N-metilacridinium nitrato)), Tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) e Ácido L-Ascórbico padrão foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chemie, Alemanha), o peróxido de hidrogênio 30% da Labsynth (Diadema, Brasil) e o dimetilsulfóxido (DMSO) da Mallinckrodt Chemicals (Philipsburg, EUA).

Os solventes grau cromatográfico metanol (MeOH) e metil *tert*-butil éter (MTBE) para HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou da Mallinckrodt Baker (Philipsburg, EUA).

Extração e determinação dos carotenoides

O método de extração dos carotenoides a partir da massa celular liofilizada dos micro-organismos foi adaptado do método utilizado por Squina e Mercadante (2003), que consiste em duas etapas: (a) rompimento da parede celular com o auxílio de almofariz, pistilo e *glass beads* e (b) extração exaustiva dos carotenoides primeiramente com acetato de etila e posteriormente com metanol. Em seguida, os extratos de carotenoides foram combinados e centrifugados a $1100 \times g$ por 5 min, para separação da biomassa. Posteriormente, o extrato de carotenoides foi filtrado em membrana de polietileno com poro de $0,22 \mu\text{m}$, secos sob fluxo de N_2 e mantido em freezer ($T < -35 \text{ }^\circ\text{C}$) sob atmosfera de nitrogênio.

O teor de carotenoides totais foi usado como parâmetro de concentração na aplicação dos métodos de avaliação da capacidade antioxidante. A quantificação de carotenoides foi realizada em espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent modelo 8453, Palo Alto, EUA) na faixa de 220 a 750 nm. A concentração total de carotenoides foi calculada através do valor obtido da absorbância no comprimento de onda máximo,

utilizando coeficiente de absorvidade ($E_{1cm}^{1\%}$) de 2540, referente ao carotenoide zeaxantina em etanol (Britton, 1995).

Análise por HPLC-DAD-MS/MS

Os carotenoides foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC Shimadzu, Kyoto, Japão) conectada a detectores de arranjo de diodos (DAD Shimadzu, Kyoto, Japão) e espectrômetro de massas com analisador ion-trap e fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI) no modo positivo (Bruker Daltonics, modelo Esquire 4000 (Bremen, Alemanha). A separação foi conduzida em coluna C₃₀ YMC (5 µm, 4,6 x 250 mm) (Waters, Wilmington, EUA) com gradiente linear de metanol/éter metil *tert*-butílico de 95:5 a 70:30 em 30 min, seguido para 50:50 em 10 min, com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna ajustada a 32 °C. Os carotenoides foram identificados considerando a ordem de eluição na coluna C₃₀ YMC, características do espectro UV-visível obtido de 220 a 700 nm e do espectro de massas (molécula protonada ([M+H]⁺) e seus fragmentos MS/MS). A porcentagem de cada carotenoide foi calculada considerando-se como 100 % a soma das áreas de todos os carotenoides identificados.

Capacidade de desativação do ABTS^{•+}

O radical ABTS^{•+} foi gerado a partir da reação em solução aquosa de ABTS (7 mM) com a solução de persulfato de potássio (2,45 mM). As duas soluções foram misturadas e mantidas em repouso no escuro à temperatura ambiente por 16 horas, segundo o método de Re et al. (1999). Após este período, esta solução foi diluída em etanol até absorvância de 0,7 (± 0,02), medida a 734 nm. O extrato de carotenoides foi solubilizado em 1 mL de etanol e diluído para gerar diferentes concentrações de carotenoides (2, 5, 10, 15 e 20 µM). Em 1,8 mL da solução etanólica ABTS^{•+} foram adicionados 200 µL dos extratos diluídos ou de etanol (branco) ou da solução padrão de Trolox (curva de calibração com concentrações de 0,001–1,5 mM) em etanol, seguido de agitação. A leitura da

absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm, por 10 minutos com leituras a cada 5 segundos para acompanhar a cinética de reação. A quantificação da capacidade antioxidante, expressa como atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), foi realizada de acordo com Re et al. (1999).

Capacidade de desativação do H₂O₂

A capacidade de desativação do H₂O₂ foi medida por quimiluminescência, através do monitoramento da oxidação da lucigenina em um leitor de microplacas (Synergy Mx, Bio-Tek, EUA) de acordo com método descrito por Costa et al. (2005). A reação foi conduzida em um volume final de 300 µL, com os seguintes reagentes nas concentrações finais: lucigenina (0,8 mM) dissolvida em tampão TRIS (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) 50 mM (pH 7,4), extrato de carotenoides em diferentes concentrações (0,2 – 8,4 µM) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), e H₂O₂ (1 % m/m). As leituras de luminescência foram executadas a 37 °C após 5 min de incubação. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo (1 mM/L), o branco foi conduzido em DMSO sem adição de H₂O₂, e o controle com DMSO e H₂O₂. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação da lucigenina pelo H₂O₂ de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição da oxidação da lucigenina pelo H}_2\text{O}_2 = 100 - \left(\frac{CL_{\text{extrato}} - CL_{\text{branco}}}{CL_{\text{controle}} - CL_{\text{branco}}} \right) \times 100$$

onde CL_{extrato} é a luminescência do sistema reacional contendo o extrato de carotenoides, CL_{controle} é a luminescência do sistema reacional contendo DMSO com H₂O₂ e CL_{branco} é a luminescência do sistema reacional contendo DMSO sem adição de H₂O₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Carotenoides de *Thermus filiformis*

A bactéria *T. filiformis* apresentou como carotenoide majoritário a termozeaxantina-15 (Figura 1) apresentando porcentagem de área de 35,3 % dentre os carotenoides identificados (Tabela 1). Foram também identificados os carotenoides: zeaxantina, zeaxantina monoglicosilada e zeaxantina monoglicosilada esterificada com ácidos graxos ramificados (Figura 2).

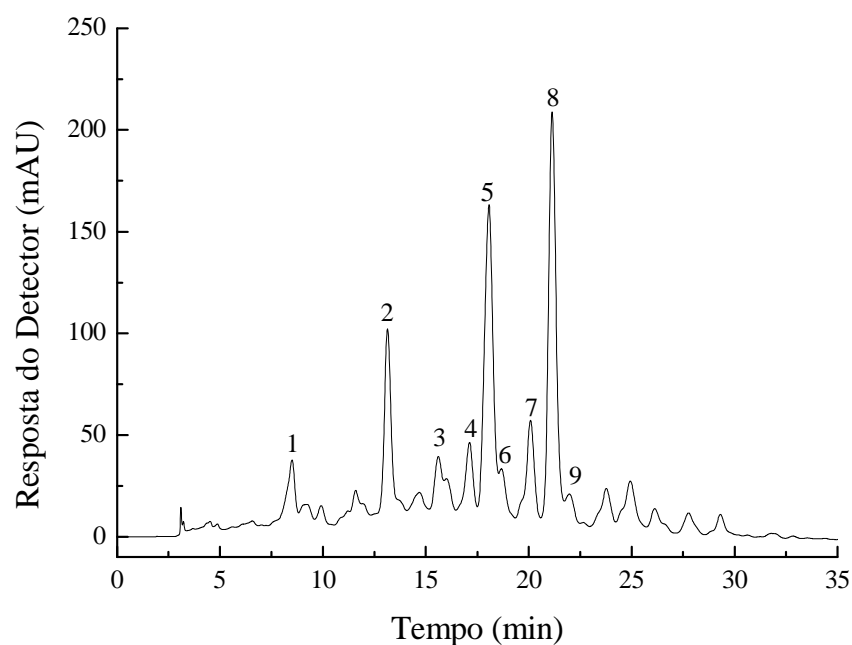


Figura 1: Cromatograma dos carotenoides de *T. filiformis* obtidos por HPLC-DAD. Condições cromatográficas: ver texto. Processado a 450 nm.

Todos os carotenoides identificados em *T. filiformis* apresentaram características espectrais semelhantes, com λ_{\max} de 449 ± 1 nm indicando um cromóforo de 11 ligações duplas conjugadas. Além disso, os baixos valores de estrutura fina indicam a presença de anel β -ionona conjugado com o cromóforo (Anexo).

Tabela 1: Características dos carotenoides, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, produzidos por *T. filiformis*.

Pico ^a	carotenoide	t _R ^b (min)	λ _{max} ^c (nm)	% III/II	% A _B /A _{II}	[M+H] ⁺ (m/z)	Fragmentos de íons MS/MS (m/z)
1	zeaxantina monoglicosilada	8,5	335, 424, 449, 476	4	19	731	713 [M+H -18] ⁺ , 569 [M+H-162] ⁺ , 551 [M+H-162-18] ⁺ , 533 [M+H-162-18-18] ⁺
2	all- <i>trans</i> -zeaxantina	13,1	342, 424, 449, 476	25	0	569	551 [M+H-18] ⁺ , 533 [M+H-18-18] ⁺ , 477 [M+H-18-18-56] ⁺
3	termozeaxantina-11	15,6	339, 424, 448, 471	2	13	899	881 [M+H -18] ⁺ , 551 [M+H-162-186] ⁺ , 533 [M+H-162-186-18] ⁺
4	termozeaxantina-12	17,1	336, 424, 448, 473	20	16	913	895 [M+H -18] ⁺ , 551 [M+H-162-200] ⁺ , 533 [M+H-162-200-18] ⁺
5	termozeaxantina-13	18,0	338, 424, 449, 474	20	9	927	909 [M+H -18] ⁺ , 551 [M+H-162-214] ⁺ , 533 [M+H-162-214-18] ⁺
6	termozeaxantina-13 ^d	18,7	338, 423, 449, 473	10	14	927 ^e	nd ^f
7	termozeaxantina-14	20,0	337, 424, 449, 474	20	16	941	923 [M+H -18] ⁺ , 551 [M+H-162-228] ⁺ , 533 [M+H-162-228-18] ⁺
8	termozeaxantina-15	21,1	339, 424, 450, 476	20	12	955	937 [M+H -18] ⁺ , 551 [M+H-162-242] ⁺ , 533 [M+H-162-242-18] ⁺
9	termozeaxantina-15 ^d	22,0	338, 424, 449, 473	10	11	955	937 [M+H -18] ⁺ , 551 [M+H-162-242] ⁺ , 533 [M+H-162-242-18] ⁺

^a numerado de acordo com a Figura 1

^b tempo de retenção na coluna C30

^c gradiente linear de metanol/TBME

^d este isômero pode ser 9-*cis* ou 9'-*cis* ou com ácido graxo iso

^e massa não foi fragmentada

^f nd: não detectado

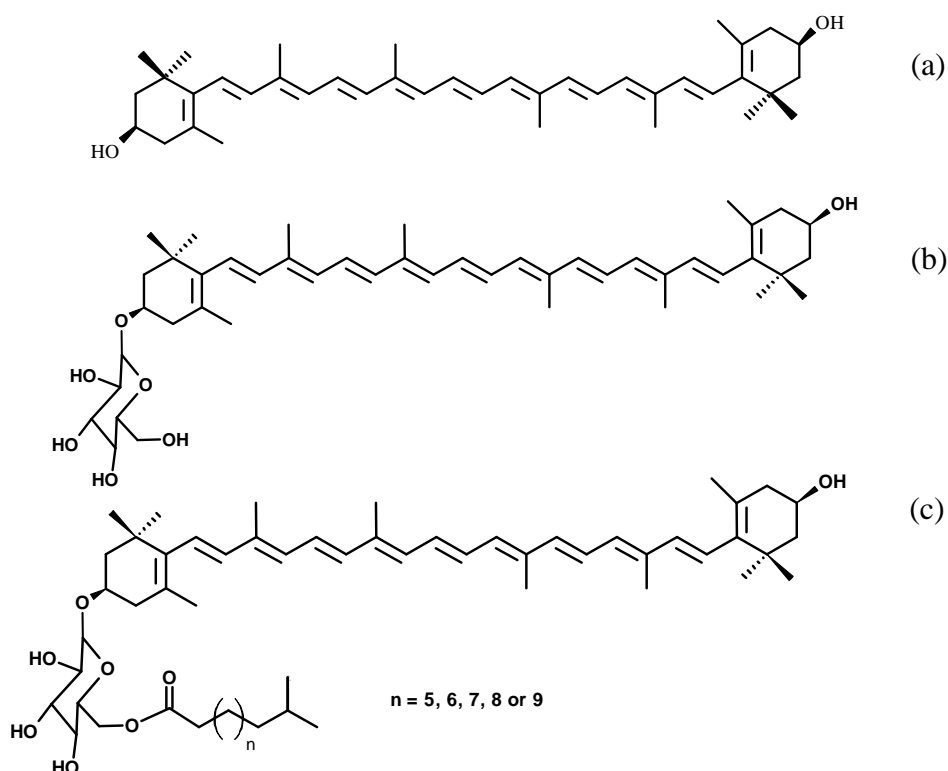


Figura 2: Estrutura química dos carotenoides identificados em *T. filiformis*. (a) zeaxantina; (b) zeaxantina monoglicosilada; (c) termozeaxantina-11 a 15.

O pico 1 foi identificado como zeaxantina monoglicosilada (4,7 %) com $[M+H]^+$ a m/z 731 e fragmentos de massas devido a perda de um grupo hidroxila na forma de água ($[M+H-18]^+$) e perda de 162 u, característico de uma hexose. Considerando que na bactéria *Thermus thermophilus*, a hexose ligada ao carotenóide foi identificada como sendo referente a uma glucose por meio de espectroscopia NMR (Yokoyama et al., 1995), há grande probabilidade que a hexose presente na estrutura do carotenóide produzido pela *T. filiformis* seja também uma glucose.

O pico 2 foi identificado como all-*trans*-zeaxantina (14,4 %) com $[M+H]^+$ a m/z 569 e fragmento de massas com eliminação de dois grupos hidroxila ($[M+H-18-18]^+$) e de fragmento com 56 u referente a parte do anel β . A confirmação da identificação foi

realizada através da cromatográfica de padrão de all-*trans*-zeaxantina, sendo que as características espectrais foram idênticas às obtidas na amostra.

Os picos 3 a 9 foram identificados como termozeaxantinas. Todos apresentaram perdas comuns de um grupo hidroxila ($[M+H-18]^+$) e de 162 u (hexose). Porém, estes carotenoides se diferenciam entre si pelo tamanho da cadeia de ácido graxo que apresentam. Em *T. filiformis* foram identificados: termozeaxantina-11 (2,3 %) com $[M+H]^+$ a m/z 899 e fragmento de massas com eliminação de 186 u proveniente do ácido graxo saturado de 11 carbonos, termozeaxantina-12 (5,2 %) com $[M+H]^+$ a m/z 913 e fragmento de massas com eliminação de 200 u proveniente do ácido graxo saturado de 12 carbonos, termozeaxantina-13 (25,4 %) com $[M+H]^+$ a m/z 927 e fragmento de massas com perda de 214 u ($C_{13}H_{26}O_2$) proveniente do ácido graxo de 13 carbonos, um isômero 9-*cis* ou 9'-*cis* ou com ácido graxo iso de termozeaxantina-13 (0,8 %) com $[M+H]^+$ a m/z 927 (massa não fragmentada), termozeaxantina-14 (9,0 %) com $[M+H]^+$ a m/z 941 e perda de fragmento com 228 u proveniente do ácido graxo com 14 carbonos, termozeaxantina-15 com $[M+H]^+$ a m/z 955 e fragmento de massas com eliminação de 242 u ($C_{15}H_{30}O_2$) proveniente do ácido graxo saturado de 15 carbonos e um isômero 9-*cis* ou 9'-*cis* ou com ácido graxo iso de termozeaxantina-15 (2,8 %) com a mesma massa e mesmos fragmentos da termozeaxantina-15. Segundo a literatura, os ácidos graxos de *T. filiformis* são em sua maioria saturados e ramificados no antepenúltimo carbono da cadeia (Chung et al., 2000), no entanto a presença e posição da ramificação não são possíveis de serem detectadas pela técnica de HPLC-DAD-MS/MS.

Pesquisas revelam que as termozeaxantinas têm importância na adaptação às altas temperaturas das bactérias do gênero *Thermus*. Estas bactérias crescem em fontes termais e devem adequar seu crescimento a altas temperaturas. Considerando que os carotenoides podem influenciar as propriedades dinâmicas das membranas (Strzalka e Gruszecki 1994). Assim sendo, foi proposto que as termozeaxantinas contribuem para o estabelecimento de uma fluidez da membrana apropriada para o crescimento da bactéria a altas temperaturas (Yokoyama et al., 1996; Hara et al., 1999).

Capacidade antioxidante

O extrato rico em carotenoides da bactéria termófila apresentou valor de TEAC de 2,87, valor ligeiramente inferior ao do licopeno (3,08) (Re et al. 1999). Tanto os carotenoides da bactéria quanto o licopeno apresentam 11 ligações duplas conjugadas, a diferença está nos grupos terminais destes carotenoides, o licopeno apresenta grupos terminais acíclicos (grupo terminal ψ) já os carotenoides da bactéria apresentam grupos terminais cíclicos (anel β), o que provavelmente diminui a capacidade de desativar o radical $ABTS^{*+}$. Segundo Miller et al. (1996) a habilidade dos carotenoides de desativarem o radical $ABTS^{*+}$ aumenta com a extensão do sistema de ligações duplas conjugadas, no entanto, a presença de grupos terminais cíclicos diminui a contribuição da dupla ligação na capacidade de desativação do radical. Por outro lado, o extrato rico em carotenoides da bactéria termófila apresentou valor superior de TEAC ao do β -caroteno (2,57) (11 ligações duplas conjugadas e 2 anéis β terminais) e zeaxantina (1,40) (11 ligações duplas conjugadas, 2 OH e 2 anéis β terminais) (Miller et al. 1996), embora estes carotenoides possuam o mesmo cromóforo e se diferenciem pela polaridade.

Como pode ser observado na Figura 3, a capacidade de desativação do H_2O_2 foi dose-dependente da concentração de carotenoides. O extrato da bactéria *T. filiformis* apresentou capacidade de desativar o H_2O_2 com um IC_{50} de 4,24 μM . Este valor foi inferior ao encontrado por Tian et al. (2007) para o licopeno (IC_{50} de 70 μM), luteína (IC_{50} de 120 μM) e zeaxantina (IC_{50} de 200 μM).

Pesquisas anteriores demonstraram que a capacidade antioxidante dos carotenoides está relacionada ao comprimento do sistema de duplas ligações conjugadas e a presença de grupos funcionais (Albrecht et al., 2000), provavelmente no caso do extrato de *T. filiformis* a presença de grupos funcionais é o que tem maior influência na atividade antioxidante uma vez que os carotenoides dessa bactéria apresentam um sistema de 11 ligações duplas conjugadas. Além disso, a capacidade antioxidante do extrato rico em carotenoides de *T. filiformis* pode ter influência de outros compostos presentes no extrato, uma vez que não foi realizada a purificação do extrato rico em carotenoides.

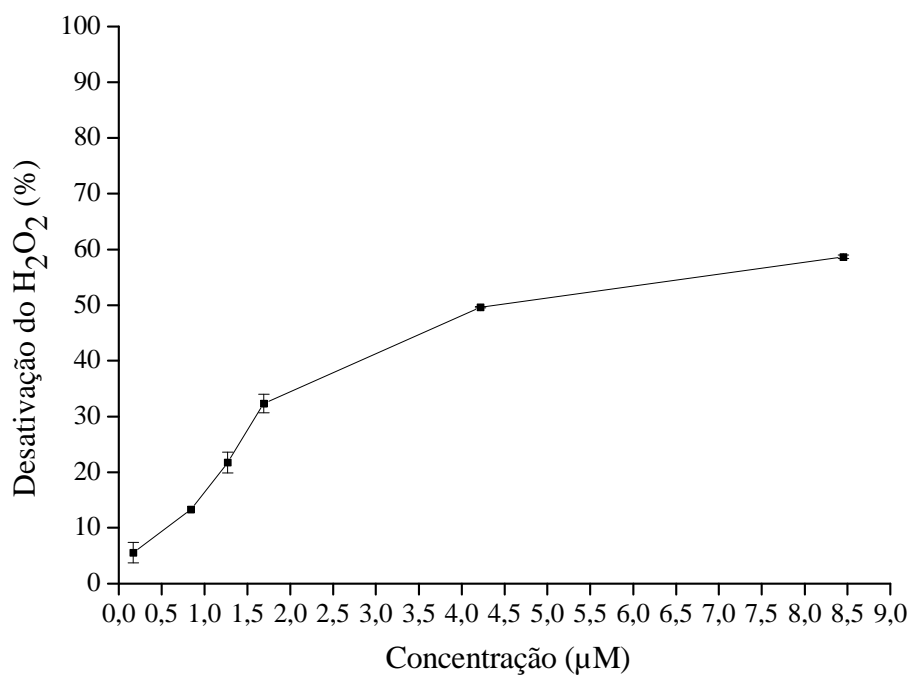


Figura 3: Capacidade de desativação do H₂O₂ do extrato rico em carotenoides de *T. filiformis*. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão dos valores obtidos de três experimentos, realizados em triplicata.

Através da técnica de HPLC-DAD-APCI-MS/MS aplicada no presente estudo foram obtidas informações relevantes sobre a estrutura dos carotenoides sintetizados pela bactéria *T. filiformis*. Além disso, o extrato rico em carotenoides dessa bactéria apresentou capacidade antioxidante na desativação do radical ABTS^{•+} e do H₂O₂, superior ao de padrões de carotenoides relatados na literatura, apresentando assim um potencial de aplicabilidade no mercado alimentício, farmacêutico, de cosméticos entre outros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica) e a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Albrecht M, Takaichi S, Steiger S, Wang Z, Sandmann G (2000) Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 18: 843-846.
- Britton G (1995) UV/Vis Spectroscopy. In: *Carotenoids: Spectroscopy*, vol 1B. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.). Birkhauser, Basel, Switzerland.
- Chung AP, Rainey FA, Valente M (2000) *Thermus igniterrae* sp. Nov. and *Thermus antranikianii* sp. Nov., two new species from Iceland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 209-217.
- Costa D, Gomes A, Reis S, Lima JLFC, Fernandes E (2005) Hydrogen peroxide scavenging activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Life Science*, 76: 2841-2848.
- Greenberg ER, Baron JA, Stuket TA, Stevens MM, Mandel JS, Spencer SK, Elias PM, Lowe N, Nierenberg DW, Bayrd G, Vance JC, Freeman DH, Clendenning WE, Kwan T and the Skin Cancer Prevention Study Group (1990) A clinical trial of β -carotene to prevent basal-cell and squamous cell cancers of the skin, *The New England Journal of Medicine*, 323: 789-795.
- Hara M, Yuan H, Yang Q, Hoshino T, Yokoyama A, Miyake J (1999) Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1461: 147-154.
- Hennekens CH (1997) β -Carotene supplementation and cancer prevention. *Nutrition*, 13:697-699.
- Huber R, Stetter KO (2004) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Springer-Verlag, New York.
- Hudson JA, Morgan HW, Daniel RM (1987) *Thermus filiformis* sp. Nov., a filamentous caldoactive bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37: 431-436.
- Mathews MM (1966) Ultrastructure of nonphotosynthetic carotenoid-containing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 91: 1369-1371.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384: 240-242.
- Moeller SM, Jacques PF, Blumberg JB (2000) The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *Journal of the American College of Nutrition*, 19: 522S-527S.
- Peto R, Doll R, Buckley JD, Sporn MB (1981) Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, 290: 201-208.
- Ramaley RF and Hixson J (1970) Isolation of a nonpigmented, thermophilic bacterium similar to *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 103: 527-528.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C A (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
- Squina FM, Mercadante AZ (2003) Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Braz J Pharm Sci* 39: 309-318.

- Stahl W, Sies H (1996) Lycopene-A biologically important carotenoid for humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336: 1–9.
- Strzalka K, Gruszecki WI (1994) Effect of β -carotene on structural and dynamic properties of model phosphatidylcholine membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1194: 138–142.
- Tian B, Xu Z, Sun Z, Lin J, Hua Y (2007) Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 902–911.
- Yokoyama A, Sandmann G, Hoshino T, Adachi K, Sakai M, Shizuri Y (1995) Thermozeaxanthins, new carotenoid-glycoside-esters from thermophilic Eubacterium *Thermus thermophilus*. *Tetrahedron Letters*, 36: 4901-4904.
- Yokoyama A, Shizuri Y, Hoshino T, Sandmann G (1996) Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Archives of Microbiology*, 165: 342-345.

CAPÍTULO III

**Evaluation by fractional factorial design of biomass production,
carotenoid level and antioxidant capacity from *Thermus
filiformis***

Manuscrito submetido para a revista
Brazilian Journal of Microbiology

ABSTRACT

A fractional factorial design 2^{5-1} was used to evaluate the effect of temperature, pH, concentrations of yeast extract, tryptone and Nitsch's trace elements on the biomass, total carotenoids and protection against singlet oxygen by carotenoid extracts of the bacterium *Thermus filiformis*. In addition, the carotenoid composition was determined by high-performance liquid chromatography connected to a diode array and mass spectrometer detectors (HPLC-DAD-MS/MS). Results of the fractional factorial design showed that temperature had a negative effect on biomass production and a positive effect on carotenoid content and protection against singlet oxygen, besides, high levels of pH value, concentrations of yeast extract and tryptone had a positive effect on biomass production only at lower temperatures. The main carotenoids of *T. filiformis* were thermozeaxanthins. In the tested conditions, changes in the levels of the variables influenced the biomass, carotenoid production, and protection against singlet oxygen, although they did not influence the carotenoid composition. The results of this study provide a better understanding on the interactions among certain nutritional and cultivation conditions of a thermophilic bacterium, *Thermus filiformis*, on biomass and carotenoid amounts, as well as on antioxidant capacity.

Keywords: thermophilic bacterium, carotenoids, HPLC-DAD-MS/MS, antioxidant capacity, factorial design.

INTRODUCTION

Carotenoids belong to a group of natural pigments widely distributed in the nature with a huge diversity of chemical structures and functions. The major industrial sources of carotenoids are chemical synthesis and extraction from plants and microalgae; however, there are few carotenoids which production is economically feasible (Gu et al. 2008).

The interest on carotenoids has considerably increased in the last years due to the known evidence of their benefits to the human health (Krinsky 1994; Rajawat et al. 2009). One of the important characteristics of carotenoids is their ability to act as antioxidants, protecting cells and tissues from damaging effects of free radicals and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). The free radicals and $^1\text{O}_2$ produced by the normal aerobic metabolism are highly reactive, and in case of oxidative stress, these oxidants can react with various components of living cells, such as proteins, DNA, or lipids, and cause structural changes leading to many diseases. The antioxidant mechanism of carotenoids is attributed to their ability to quench $^1\text{O}_2$ and scavenge free radicals (Sachindra et al. 2007).

Several environments considered extreme and hostile to allow survival and growth of living organism are colonized by microorganisms that are specifically adapted to these niches. In this context, it is now recognized that extremophile microorganisms are a rich source of molecules of industrial interest and a great resource for developing new biotechnological applications that can revolutionize our daily lives and the advancement of knowledge (Rothschild and Mancinelli 2001). One of the properties of such microorganisms is their ability to adapt to extreme environments, in which factors, such as pH, temperature, pressure and salt concentration, exceed the values considered as standard for most living beings (Gomes et al. 2007).

Among all extreme environments, the temperature is the parameter that most influence the function of biomolecules and the maintenance of the biological structures. High temperature can lead to denaturation of the enzymes responsible by carotenoids biosynthesis (Aksu and Tugba 2005); however, extremophilic enzymes are characterized by

higher thermostability and reaction rate, with optimum activity as high as 90 °C (Morozkina et al. 2010). The existence of stable geothermal environments has allowed the selection or the persistence of microorganisms that not only survive but also need high temperatures to survive (Gomes et al. 2007).

Bacteria of the genus *Thermus*, belong to the Thermaceae family, are Gram negative, aerobic, and catalase positive. In general, *Thermus* bacteria have an optimum growth between 70 and 75 °C; however, some species grow at lower temperatures, around 60 °C. The optimum pH range for these bacteria is between 7.5 and 8.0, although they can grow at lower (~ 5.1) or higher (~ 9.5) pH values (Huber and Stetter 2004). According to Brock and Freeze (1969), the bacteria from *Thermus* genus can use amino acids or ammonium salts as nitrogen sources and sugar or organic acids as carbon sources. Unlike typical Gram-negative bacteria, the outer membranes of *Thermus* species are not composed of lipopolysaccharides but of peculiar glycolipids, whose structures seem to be strictly involved in the adaptation to high temperatures (Leone et al. 2006).

The bacterium *Thermus filiformis* was first isolated in 1987 from a hot spring in New Zealand. This bacterium synthesizes yellow carotenoids, low levels of iso-branched fatty acids, and high levels of anteiso-branched fatty acids (Hudson et al. 1987). These characteristics distinguish *T. filiformis* from all other *Thermus* species.

Nutritional and physical factors, such as concentration and type of nitrogen and carbon sources, minerals, pH, aeration, temperature and light have an influence on the cellular growth, composition and production of carotenoids by microorganisms (Britton 1998). Therefore, studies to improve conditions and composition of the culture medium should be carried out for each microorganism. Even though, most studies were conducted with fungi, yeast and microalgae (Bhosale 2004), mainly related to the production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* (Orosa et al. 2005) and *Phaffia rhodozyma* (Fontana et al. 1997), and to the production of β -carotene by *Dunaliella* sp. (Vandamme 1992) and *Blakeslea trispora* (Feofilova 1994).

The aim of this study was to determine the simultaneous influence of temperature, pH, concentrations of yeast extract, tryptone and Nitsch's trace elements on the biomass and carotenoid production, as well as on the protection against $^1\text{O}_2$ by the

carotenoid extracts produced by *T. filiformis* ATCC 43280, using a fractional factorial design and evaluate the carotenoid profile by high-performance liquid chromatography connected to a diode array and mass spectrometer detectors (HPLC-DAD-MS/MS). *T. filiformis* was chosen because although it has been firstly described in 1987, only genetic studies were found in the literature (Choi et al. 2001; Jeon et al. 2004). In fact, to the best of our knowledge, no report is available in the literature regarding the use of fractional factorial design to study the biomass, carotenoid production or protection against singlet oxygen of any bacteria from the *Thermus* genus.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain

The strain of the bacterium *Thermus filiformis* (ATCC 43280) was obtained from the “Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz”, located in Rio de Janeiro, Brazil. The strain was maintained in the Castenholz TYE 1 % medium and a stock culture was stored at -70 °C in Castenholz TYE 1 % broth with glycerol.

Culture medium and conditions

Castenholz TYE 1 % medium was sterilized in autoclave at 120 °C for 20 min at 1 atm (Hudson et al. 1987). The culture medium was altered according to the different conditions of the experimental design shown in Tables 1 and 2.

Table 1: Independent variable levels used in the fractional factorial design.

Independent Variable		Level (coded)		
		- 1	0	+ 1
X ₁	Temperature (°C)	65	70	75
X ₂	pH	7.0	7.5	8.0
X ₃	Tryptone (g/L)	5.0	7.5	10.0
X ₄	Yeast extract (g/L)	5.0	7.5	10.0
X ₅	Nitsch's trace elements (mL/L)	2.0	3.0	4.0

The cultivation of the bacterium was carried out in three consecutive phases. In the first phase, the bacterium was grown in Castenholz TYE 1 % medium and incubated at 70 °C for 24 hours. For the second phase (pre-inoculum), part of the culture was transferred to Erlenmeyer flasks of 500 mL, containing culture broth, following by incubation at 70 °C, 230 rpm during 48 hours. The pre-inoculum reached a cellular density of 10⁹ cells/mL.

In the third phase, the inoculum was prepared in Erlenmeyer flasks of 1000 mL, with 10 % (v/v) of pre-inoculum, followed by incubation at the same conditions used in the pre-inoculum.

Experimental design and statistical analysis

A fractional factorial design was used in order to evaluate the effect of certain conditions of the culture medium and cultivation on dry biomass production (g/L of culture broth), total carotenoids (µg/g of dry biomass) and protection against ¹O₂ by the carotenoid extract (%). The values for the levels of each independent variable: temperature (°C), pH, concentrations of yeast extract (g/L), tryptone (g/L) and Nitsch's trace elements (mL/L), Table 1, were established based on literature data about thermophile microorganisms (Hudson et al. 1987; Boone et al. 2001). A fractional factorial design 2⁵⁻¹ with 3 central points (Box et al. 1978) was used, totalizing 19 experiments (Table 2).

The experimental responses were analyzed using the “Experimental Design” module of the Statistica 6.0 program (Statistica 2001) to determine the effect of the independent variables (temperature, pH, concentrations of yeast extract, tryptone and

Nitsch's trace elements) and the interaction among them on the following responses: biomass production, total carotenoid levels and protection against $^1\text{O}_2$.

Determination of dry biomass

The inoculum was centrifuged at 23900 g by 10 min at 10 °C in refrigerated centrifuge (Sorval Instruments RC5C – Dupont[®]) and the supernatant was discarded. The cellular mass was washed once with distilled water followed by centrifugation. The pellet was frozen in Petri dishes at -35 °C for later freeze-drying and weighing for quantification of the dry biomass produced by culture liter.

Determination of carotenoids

The carotenoid extraction was carried out according to the method of Squina and Mercadante (2003), with some modifications. The carotenoids were exhaustively extracted by maceration of dry biomass (30 mg) with ethyl acetate firstly and then with methanol in porcelain capsules with glass beads, followed by centrifugation at 1100 g for 5 min. This procedure was repeated several times until the biomass became colorless. The carotenoid extract was filtered in polyethylene membrane with 0.22 μm pore, dried under nitrogen flow and stored in the freezer ($T < -35$ °C) under nitrogen atmosphere.

The total carotenoid content was calculated using the absorbance measured at the maximum wavelength (λ_{max}) in a diode array spectrophotometer (Agilent model 8453, Palo Alto, USA) in the range from 220 to 700 nm. The concentration of carotenoids was calculated using the Lambert - Beer law and absorption coefficient ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) of 2450 for zeaxanthin in ethanol (Britton 1995).

In addition, the carotenoids were analyzed by high-performance liquid chromatography connected to photodiode array and mass spectrometry detectors (HPLC-DAD-MS/MS). The carotenoids were separated on a C₃₀ YMC column (5 μm , 4.6 x 250 mm) (Waters, Wilmington, USA) with a linear gradient of methanol/methyl *tert*-butyl ether from 95:5 to 70:30 in 30 min, followed by 50:50 in 10 min at 0.9 ml/min and column

temperature set at 32 °C (De Rosso and Mercadante 2007). The carotenoids were identified considering the elution order on the C₃₀ YMC column, characteristics of the UV-visible spectra, protonated molecule ([M+H]⁺) and MS/MS fragments (data not shown).

Determination of antioxidant activity

The percentage of protection against ¹O₂ was performed by reaction of a 1 g/L of 9, 10-dimethylantracene (DMA), as actinometer, in ethyl acetate with methylene blue (MB) (13 μM) in ethanol, as sensitizer. In a cuvette of 1.5 mL, 880 μL of MB, 20 μL of DMA and 100 μL of extract or ethanol: ethyl acetate (1:1) (control) were added. The system was submitted to an excitation source with a 150 W filament xenon lamp coupled to a set of red and orange cut-off filter to avoid direct excitation of the carotenoids. The reaction was monitored by absorbance measurements between 200 and 800 nm during 10 min.

The protection was calculated according to equation 1.

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

where $k_{\text{obs}}^{\text{DMA}}$ and $k_{\text{obs}}^{\text{DMA+CAR}}$ were the first order rate constants for DMA (absorbance at 374 nm) in the absence and presence of carotenoid extract, respectively.

RESULTS

The results summarized in Table 2 show the influence of temperature, pH, concentrations of yeast extract, tryptone and Nitsch's trace elements on the contents of dry biomass, total carotenoid and protection against ¹O₂ by carotenoid extracts, using a fractional factorial design. The effect of each factor and their interactions were obtained with confidence interval of 95 % (Table 3).

Table 2: Matrix with coded values of the fractional factorial design 2^{5-1} and responses obtained for *Thermus filiformis*.

Assay	Variable level (coded)					Response		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Biomass (g of cells/ L of culture)	Carotenoids (µg/g of dry biomass)	% protection*
1	-1	-1	-1	-1	1	0.380	475.1	51.5
2	1	-1	-1	-1	-1	0.380	1517.4	85.1
3	-1	1	-1	-1	-1	0.329	383.9	46.1
4	1	1	-1	-1	1	0.380	823.6	49.0
5	-1	-1	1	-1	-1	0.476	473.5	33.6
6	1	-1	1	-1	1	0.451	1093.9	82.9
7	-1	1	1	-1	1	0.464	489.6	57.1
8	1	1	1	-1	-1	0.384	1328.6	71.9
9	-1	-1	-1	1	-1	0.491	688.2	34.4
10	1	-1	-1	1	1	0.520	1019.6	42.7
11	-1	1	-1	1	1	0.504	493.0	31.4
12	1	1	-1	1	-1	0.113	559.4	64.8
13	-1	-1	1	1	1	0.376	137.6	4.3
14	1	-1	1	1	-1	0.169	845.6	40.4
15	-1	1	1	1	-1	0.658	336.5	48.9
16	1	1	1	1	1	0.122	694.9	60.5
17	0	0	0	0	0	0.327	318.9	65.7
18	0	0	0	0	0	0.322	369.9	42.2
19	0	0	0	0	0	0.331	276.7	39.0

X₁ – temperature; X₂ – pH; X₃ – yeast extract; X₄ – tryptone; X₅ – Nitsch's trace elements

* % of DMA protection against ¹O₂.

Table 3: Effect of the variables on the biomass production, total carotenoid production and protection against singlet oxygen (only the significant values are shown).

Response	Effect of the Significant Variables		p	R ²
Biomass production (g/L)	X ₁	-0.15	< 0.001	0.96
	X ₁ *X ₂	-0.09	0.002	
	X ₁ *X ₃	-0.07	0.015	
	X ₁ *X ₄	-0.13	< 0.001	
	X ₁ *X ₅	0.08	0.005	
	X ₂ *X ₃	0.08	0.008	
	X ₃ *X ₄	-0.08	0.008	
	X ₃ *X ₅	-0.09	0.003	
Total carotenoid production (µg/g)	X ₁	550.72	0.001	0.82
	X ₄	-226.34	0.090	
	X ₁	3.96	< 0.001	
% of protection	X ₄	-3.12	0.001	0.91
	X ₂ *X ₃	2.08	0.014	
	X ₂ *X ₄	2.35	0.008	

X₁ – temperature; X₂ – pH; X₃ – yeast extract; X₄ – tryptone; X₅ - Nitsch's trace elements.

Effect of the independent variables on biomass production

The assay with the highest yield of biomass was number 15 (Table 2) with 0.658 g/L where the variables temperature and concentration of Nitsch's trace elements were adjusted at the lowest level (65 °C and 2.0 mL/L, respectively) and pH, concentrations of yeast extract and tryptone at the highest level (8.0, 10.0 and 10.0 g/L, respectively). The lowest biomass production was observed in assay number 12 with 0.113 g/L where the values of temperature, pH and concentration of tryptone were adjusted at 75 °C, 8.0 and 10.0 g/L, respectively, whilst concentrations of yeast extract and Nitsch's trace elements at 10.0 g/L and 2.0 mL/L, respectively.

The results reported in Table 3 shows that the model for biomass production has a R-square of 0.96, The R-square value is an indicator of how well the model fits the data, i.e., an R-square close to 1.0 indicates that almost all of the variability was accounted

with the variables specified in the model (Statistica 2001). For biomass production, only temperature had a significant linear effect ($p < 0.001$), with higher biomass production at lower temperatures. In addition, interactions of temperature with pH, concentrations of yeast extract, tryptone and Nitsch's trace elements also had a significant effect on biomass production.

Effect of the independent variables on carotenoid production

The highest amount of total carotenoids (1517.4 $\mu\text{g/g}$) was observed in assay number 2, where the independent variables were adjusted at the lowest level with exception of the temperature, which was fitted to the highest level. On the other hand, the lowest carotenoid production (137.6 $\mu\text{g/g}$) was observed in assay number 13 where only temperature and pH were fitted to the lowest level.

The model adjusted for total carotenoid production had a R-square of 0.82, and both temperature and concentration of tryptone had a significant linear effect ($p < 0.001$ and $p < 0.090$, respectively). Temperature had a positive effect (550.72) whilst concentration of tryptone had a negative effect (-226.34). No interactions among the independent variables had significant effect on carotenoid production.

In order to verify the composition of carotenoids produced by *T. filiformis* some assays were analyzed by HPLC-DAD-MS/MS. Independently of the cultivation conditions the identified carotenoids were the same in all the samples. Seven carotenoids produced by the strain *T. filiformis* were identified: zeaxanthin monoglucoside, free zeaxanthin and zeaxanthin monoglucoside esterified with branched fatty acids containing 11, 12, 13, 14 and 15 carbons (Figure 1). In all the assays, the major carotenoid was thermozeaxanthin-15 showing percentage ranging from 34.8 to 62.3 % (Figure 2, table 4).

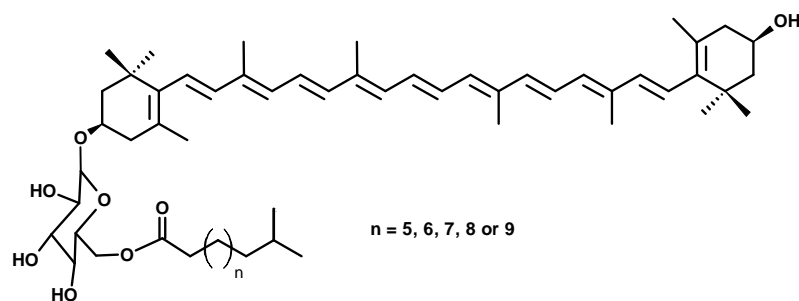


Figure 1: Zeaxanthin monoglucoside esterified with branched fatty acids.

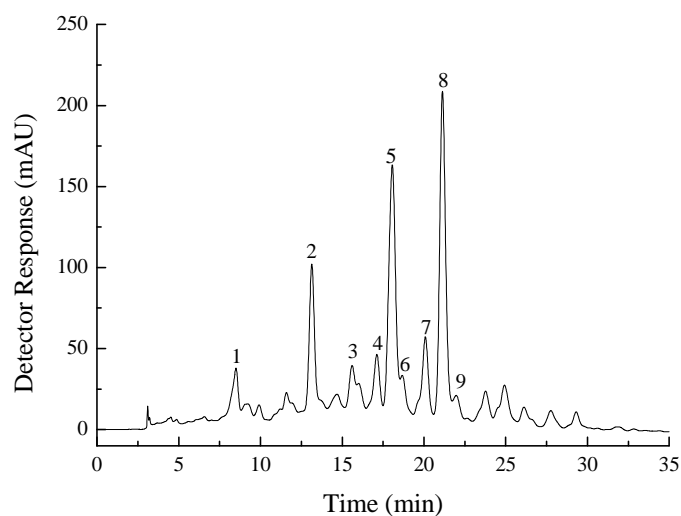


Figure 2: Chromatogram, obtained by HPLC-DAD, of the carotenoids from *Thermus filiformis* from assay 8. Peak characterization is given in Table 4. Chromatographic conditions: see text.

According to the results presented in table 4, the range of temperature studied showed influence on the carotenoid amounts, although it did not favor the biosynthesis of any particular carotenoid. On the other hand, lower pH value (pH 7.0) seems to favor the production of thermozeaxanthin–15 (62.3 %) over thermozeaxanthin–13 (17.2 %) as verified for assay 2, since at pH values of 7.5 (assay 17) and 8.0 (assay 8 and 15) the percentages of thermozeaxanthin–13 (25.4 to 32.0 %) and thermozeaxanthin–15 (34.8 to 35.9 %) were similar. In addition, free zeaxanthin was produced in higher amounts when

the pH of the medium was adjusted at higher values, indicating that the expression of *crtX*, gene coding for zeaxanthin glucosylase, seems to be down regulated at higher pH values.

Table 4: Main carotenoids produced by *T. filiformis*.

Peak	Carotenoid	Area (%) [*]			
		Assay 2 [†]	Assay 8 [†]	Assay 15 [†]	Assay 17 [†]
1	zeaxanthin monoglucoside	5.5	4.7	6.9	4.8
2	all- <i>trans</i> -zeaxanthin	4.4	14.4	8.1	6.9
3	thermozeaxanthin-11	1.9	2.3	1.8	2.2
4	thermozeaxanthin-12	2.8	5.2	1.7	5.1
5	thermozeaxanthin-13	17.2	25.4	29.0	32.0
6	thermozeaxanthin-13 ^a	0.7	0.8	7.7	3.3
7	thermozeaxanthin-14	4.9	9.0	5.3	6.9
8	thermozeaxanthin-15	62.3	35.3	34.8	35.9
9	thermozeaxanthin-15 ^a	0.2	2.8	4.7	2.8

^{*}percentage of area from the chromatogram peaks.

[†] the culture conditions of these assays are shown on Tables 1 and 2.

^a this isomer can be 9-*cis* or 9'-*cis* or with iso branched fatty acid.

Effect of the independent variables on antioxidant capacity

Since the carotenoid profiles were similar in different conditions, the protection against ¹O₂ by carotenoid extracts showed a behavior that is dependent on the amount of carotenoids present in each extract. Therefore, the highest percentage of protection against singlet oxygen (85.1 %) was observed in the assay with the highest carotenoid content (assay 2) and the lowest percentage of protection against singlet oxygen (4.3 %) was in the assay with the lowest content of carotenoid (assay 13).

The model developed for antioxidant activity had a R-square of 0.91. As well as for total carotenoid production, this response also had temperature and concentration of tryptone with significant linear effect (p<0.001 and p<0.014, respectively). Moreover, the interaction between pH and concentration of yeast extract and pH and concentration of tryptone were also significant for the antioxidant activity.

DISCUSSION

In the present study, the highest biomass amount was produced in the medium with the highest concentrations of yeast extract and tryptone (10 g/L). In disagreement with this data, Brock and Freeze (1969) observed an inhibitory effect of carbon and nitrogen sources on the cell growth cultures of *T. aquaticus* with high tryptone and yeast extract concentrations (10 g/L) at pH 7.1. On the other hand, Saiki et al. (1972) isolated a *Thermus* strain that grew in a medium with 1% tryptone and yeast extract indicating that the problem with rich culture medium was a decrease in the pH value at high temperature (~ 70 °C). This fact can be confirmed by the results observed in assays 13 and 15 (Table 2), that were performed at the same temperature and concentrations of yeast extract and tryptone but at different pH values, half of the biomass amount was produced at pH 7.0 as compared to the assay with pH 8.0

A positive influence of high temperatures on carotenoid production was found in this study. According to the literature, other microorganisms also had an increase in carotenoid production at higher temperatures. Tjahjono et al. (1994) suggested that the growth of *Haematococcus pluvialis* at high temperatures might enhance the formation of active oxygen species in the cells, which is responsible for the stimulation of carotenogenesis. A threefold increase in the carotenoid content was observed when the temperature of *Mucor rouxii* cultures was raised to 40 °C as compared to the amount obtained at the optimum growth temperature of 28 °C (Mosqueda-Cano and Gutierrez-Corona 1995).

The biomass and carotenoid production have an inverse behavior in relation to temperature; while lower temperatures had a positive effect on biomass production higher temperature were preferable for carotenoid production. A similar behavior was also noticed in investigations about lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* (Dominguez et. al. 2005).

The carotenoids identified in *T. filiformis* were mainly thermozeaxantins, which are formed by two β -ionone rings plus a glucose moiety and a branched fatty acid. These carotenoids are probably associated with the membrane since this type of carotenoid

structure is associated with microorganism membranes (Lutnaes et. al. 2004). Moreover, membrane stabilization is considered essential for the growth of thermophilic bacteria at high temperatures and bacterial carotenoids play an important role in reinforcing the membrane (Yokoyama et. al. 1995; Hara et. al. 2008).

As expected, the protection against singlet oxygen and total carotenoid production showed a direct relationship, the assays with higher amounts of carotenoids had greater percentage of DMA protection. The $^1\text{O}_2$ quenching activity of carotenoids in organic solvent is mainly dependent on the number of conjugated double bonds and to a lesser extent influenced by carotenoid end groups (cyclic or acyclic) or the nature of substituents in the cyclic end groups (Tatsuzawa et. al. 2000). It is also well known that carotenoids are efficient quenchers of both excited triplet state of photosensitizers and singlet oxygen, mainly by an energy-transfer mechanism (Montenegro et. al. 2004).

In conclusion, evaluation of the influence of temperature, pH, concentrations of yeast extract, tryptone and Nitsch's trace elements, allowed the definition of favorable conditions for biomass, carotenoid production and percentage of protection against singlet oxygen for *T. filiformis*. Since the effect of temperature was significant but contrary for biomass amount and production of carotenoids, the use of a two-phase cultivation process, where the production of carotenoids is separated from the cellular growth stage, would allow the achievement of both, high levels of cellular growth and of carotenoids.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica) and FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) for their financial support.

REFERENCES

- Aksu Z, Tugba AE. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem* 2005; 40: 2985–2991.
- Bhosale P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 63: 351-361.

- Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Michigan: USA; 2001.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters*. New York: John Wiley & Sons; 1978. p. 653.
- Britton G. Overview of Carotenoid Biosynthesis, In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. ed. *Carotenoids serie 3: Biosynthesis*. Birkhäuser: Basel; 1998. p. 13-147.
- Britton G. UV/Vis Spectroscopy. In: *Carotenoids: Spectroscopy*, 1B. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. ed. Birkhäuser: Basel, 1995. p. 13-62.
- Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non- sporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* 1969; 98: 289-297.
- Choi JJ, Kim HK, Kwon ST. Purification and characterization of the 5'→3' exonuclease domain-deleted *Thermus filiformis* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2001; 23: 1647-1652.
- De Rosso V, Mercadante A Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 5062-5072.
- Dominguez A, Pastrana L, Longo ML, Rúa ML, Sanroman MA. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem Eng J* 2005; 26: 95-99.
- Feofilova EP. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. *Appl Biochem Microbiol* 1994; 30:143-153.
- Fontana JD, Chocial MB, Baron M, Guimarães M, Maraschin M, Ulhoa C, Florencio JA, Bonfin TMB. Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: optimization of low-cost culture media and yeast cell lysis. *Appl Biochem Biotechnol* 1997; 63: 305-314.
- Gomes E, Guez MAU, Martin N, Silva R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quím Nova* 2007; 30: 136-145.
- Gu Z, Chena D, Hana Y, Chena Z, Gu, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT* 2008; 41: 1082-1088.
- Hara M, Yamano Y, Sakai Y, Kodama E, Hoshino T, Ito M, Miyake J. Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: zeaxanthin, zeaxanthin glucoside and thermozeaxanthin. *Mater Sci Eng C* 2008; 28: 274-279.
- Huber R, Stetter KO. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York: Springer-Verlag; 2004.
- Hudson JA, Morgan HW, Daniel RM. *Thermus filiformis* sp. Nov., a filamentous caldoactive bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1987; 37: 431-436.
- Jeon HJ, Shin HJ, Choi JJ, Hoe HS, Kim HK, Suh SW, Kwon ST. Mutational analyses of the thermostable NAD⁺-dependent DNA ligase from *Thermus filiformis*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 237: 111-118.
- Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem* 1994; 66: 1003-1010.
- Leone S, Molinaro A, Lindner B, Romano I, Nicolaus B, Parrilli M, Lanzetta R, Holst O. The structures of glycolipids isolated from the highly thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* Samu-SA1. *Glycobiology* 2006; 16: 766-775.

-
- Lutnaes BF, Strand G, Pétursdóttir SK, Liaaen-Jensen S. Carotenoids of thermophilic bacteria—*Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochem Syst Ecol* 2004; 32: 455–468.
- Montenegro MA, Rios ADO, Mercadante AZ, Nazareno MA, Borsarelli CD. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 367-373.
- Morozkina EV, Slutskaia ES, Fedorova TV, Tugay TI, Golubeva LI, Koroleva OV. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application. *Appl Biochem Microbiol* 2010; 46: 1–14.
- Mosqueda-Cano G, Gutierrez-Corona JF. Environmental and developmental regulation of carotenogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Curr Microbiol* 1995; 31: 141–145.
- Orosa MO, Franqueira DO, Abalde CJ. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Biores Technol* 2005; 96: 373-378.
- Rajawat YS, Hilioti Z, Bossis I. Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 199–213.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments. *Nature* 2001; 409: 1092-1101.
- Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 8516–8522.
- Saiki T, Kimura R, Arima K. Isolation and characterization of extremely thermophilic bacteria from hot springs. *Agric Biol Chem* 1972; 36: 2357-2366.
- Squina FM; Mercadante AZ. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. *Rev Bras Cien Farm* 2003; 39: 309-318.
- Statistica (data analysis software system), version 6, 2001.
- Tatsuzawa H, Maruyama T, Misawa N, Fujimori K, Nakano M. Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in *Escherichia coli* - attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids. *FEBS Letters* 2000; 484: 280-284.
- Tjahjono AE, Hayama Y, Kakizono T, Terada Y, Nishio N, Nagai S. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol Lett* 1994; 16: 133–138.
- Vandamme EJ. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J Chem Tech Biotech* 1992; 53: 313-327.
- Yokoyama A, Sandmann G, Hoshino T, Adachi K, Sakai M, Shizuri Y. Thermozeaxanthins, new carotenoid-glycoside-esters from thermophilic Eubacterium *Thermus thermophilus*. *Tetrah Lett* 1995; 36: 4901-4904.

CONCLUSÃO GERAL

Com a aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS/MS) foi possível a identificação de nove carotenoides sintetizados pela bactéria termófila *Thermus filiformis*. Os carotenoides identificados foram termozeaxantinas que consistem no carotenoide zeaxantina, acilado com uma glicose esterificada com diferentes ácidos graxos. O carotenoide majoritário encontrado foi a termozeaxantina-15 (35,3 %), seguido da termozeaxantina-13 (25,4 %), zeaxantina livre (14,4 %), termozeaxantina-14 (9,0 %), termozeaxantina-12 (5,2 %), zeaxantina monoglicosilada (4,7 %), termozeaxantina-11 (2,3 %) e derivados dos carotenoides termozeaxantina-15 (2,8 %) e termozeaxantina-13 (0,8 %).

Através do planejamento experimental fatorial fracionado foi possível avaliar o efeito das variáveis: temperatura, pH, quantidade de triptona, extrato de levedura e elementos traços de Nitsch no crescimento da biomassa, produção de carotenoides e porcentagem de proteção contra o oxigênio singlete proporcionada pelo extrato rico em carotenoides da bactéria *T. filiformis*. Dentro das faixas estudadas para cada variável, a temperatura foi a variável que mais influenciou nas respostas, sendo que um aumento na temperatura provocou a diminuição na quantidade de biomassa e um aumento na produção de carotenoides e da porcentagem de proteção contra o oxigênio singlete proporcionada pelo extrato rico em carotenoides. Estas duas últimas respostas apresentaram relação positiva, isto é, quanto maior a quantidade de carotenoides, maior a porcentagem de proteção contra o oxigênio singlete, uma vez que o perfil de carotenoides foi semelhante nos diversos pontos do planejamento, indicando que as diferentes condições de cultivo estudadas não favoreceram a síntese de um carotenoide específico.

Em relação à atividade antioxidante, na o extrato rico em carotenoides de *T. filiformis* apresentou valor de TEAC ligeiramente inferior ao do licopeno, porém superior ao do β -caroteno e ao de zeaxantina. Na desativação do peróxido de hidrogênio, o extrato rico em carotenoides de *T. filiformis* apresentou uma capacidade de desativação com IC₅₀ de 4,24 μ M.

ANEXO

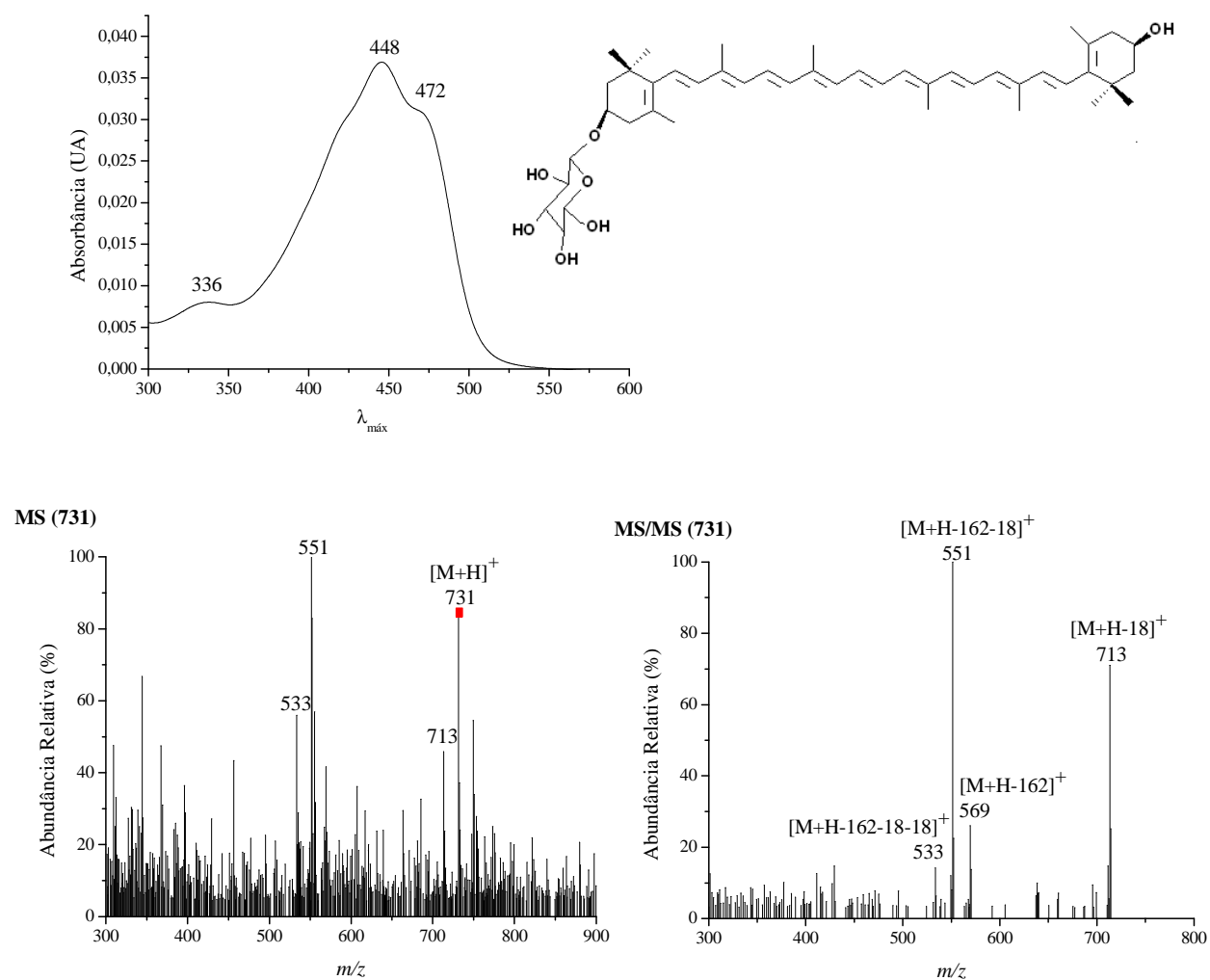
ESPECTROS DE MASSAS E UV-VISÍVEL DOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS EM *Thermus filiformis*.

Figura 1: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide zeaxantina monoglicosilada. Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

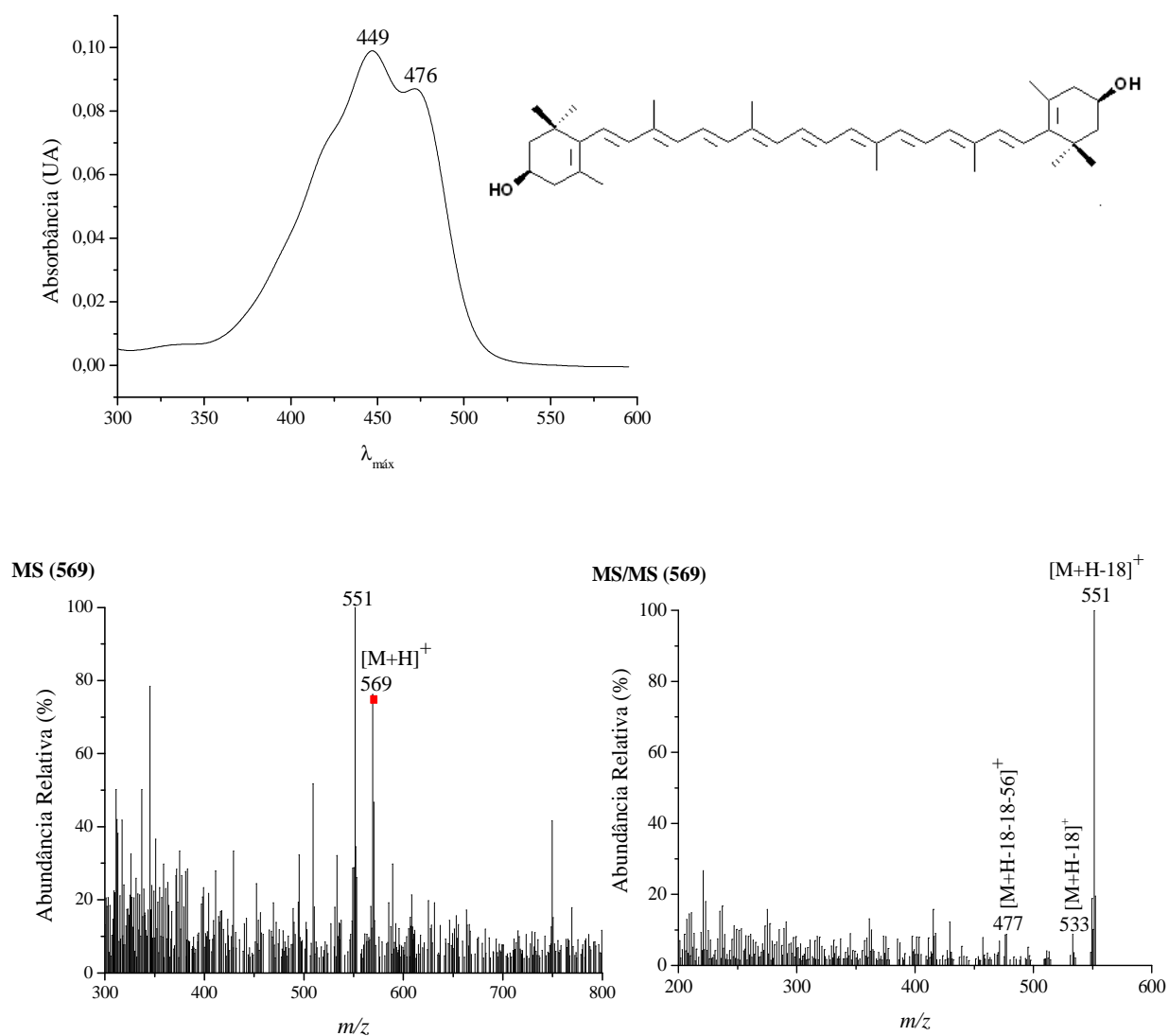


Figura 2: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide *all-trans*-zeaxantina. Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

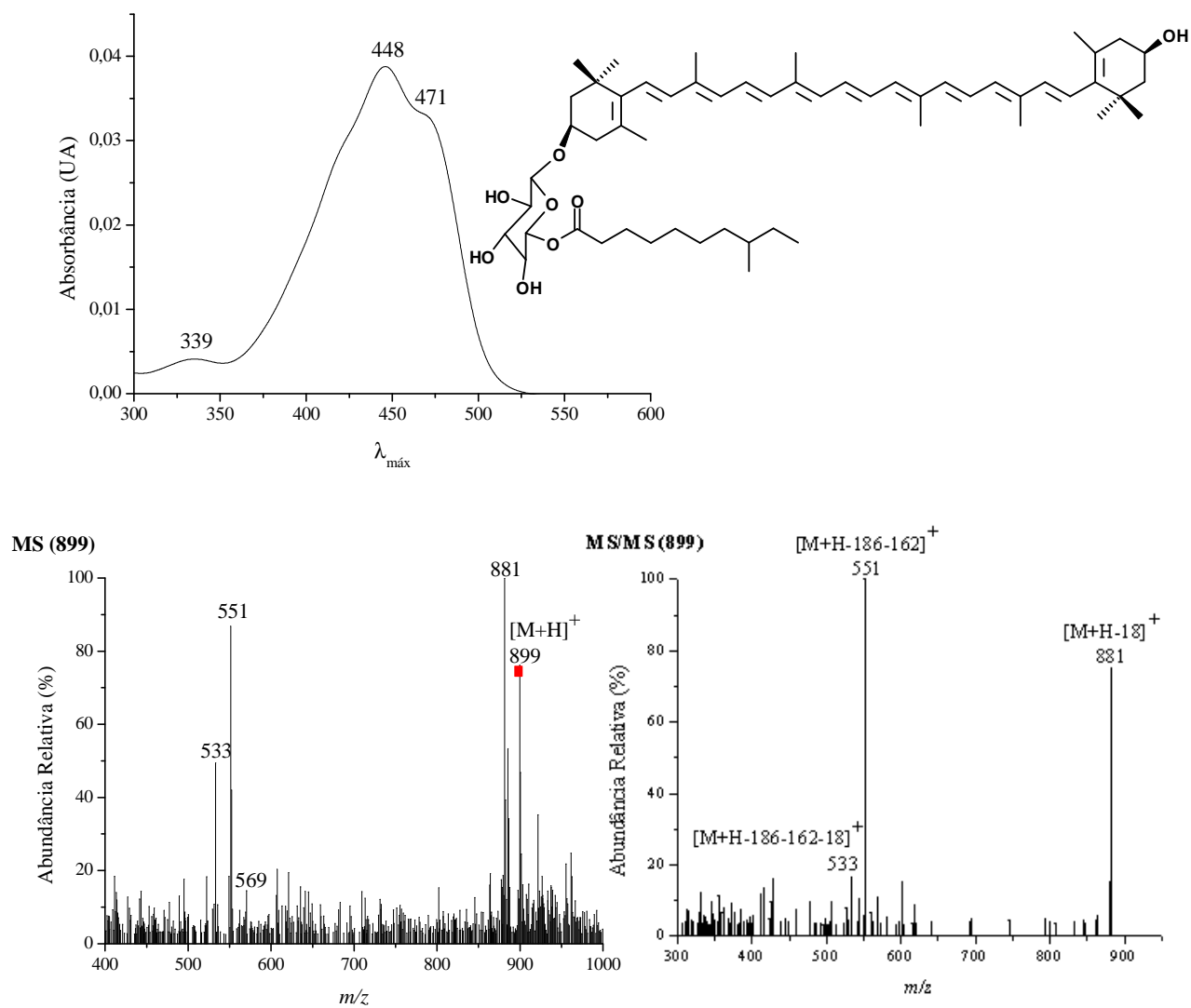


Figura 3: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide termozeaxantina-11. Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

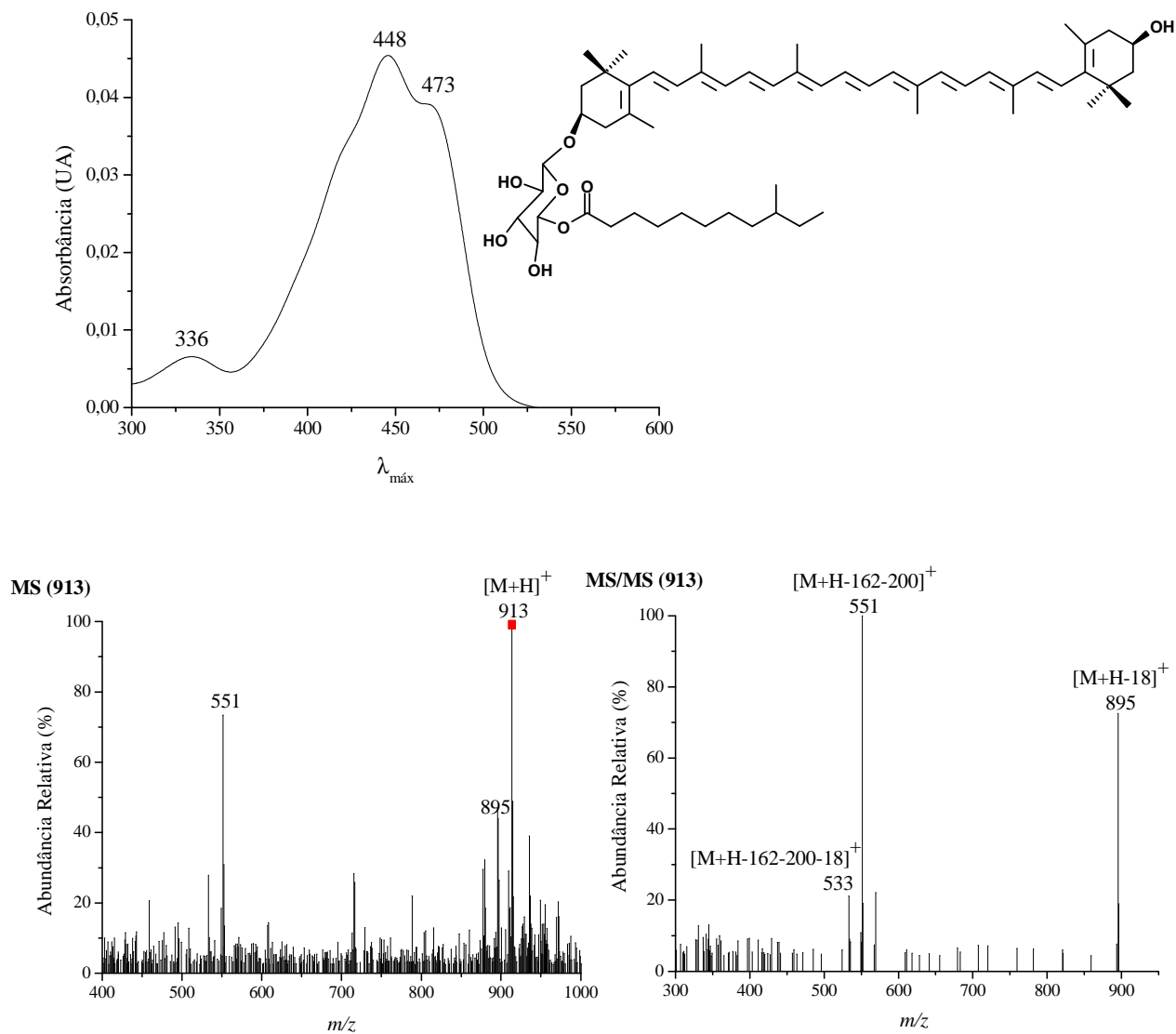


Figura 4: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide termozeaxantina-12. Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

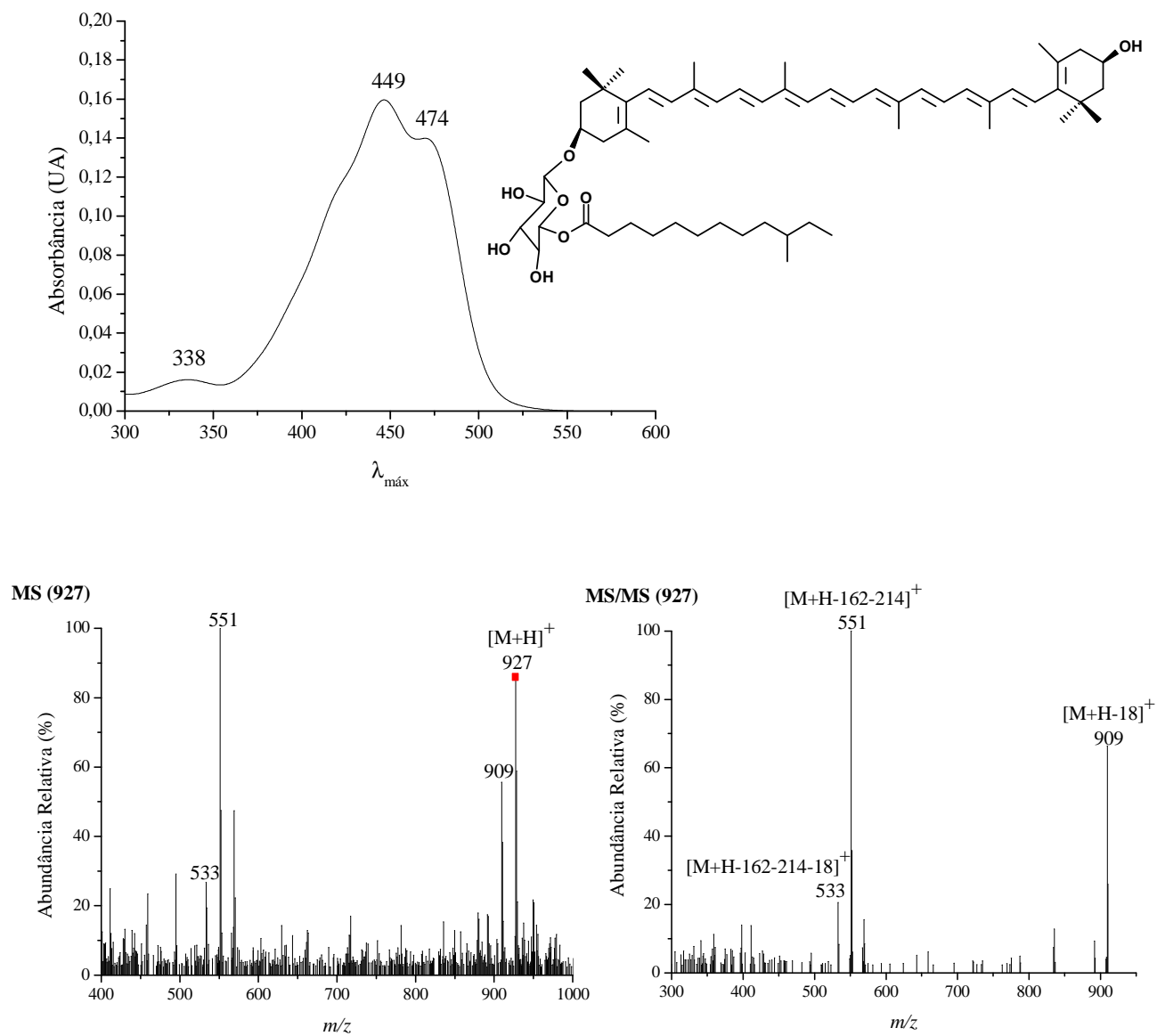


Figura 5: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide ternaixantina-13. Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

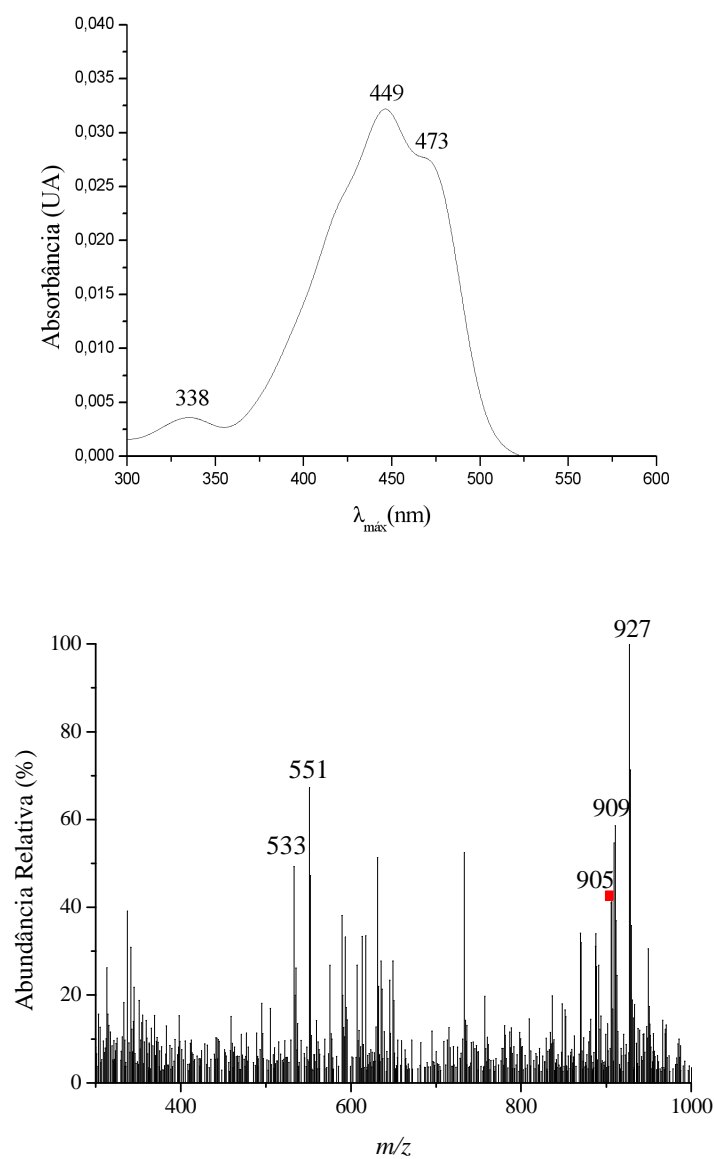


Figura 6: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide identificado isômero de termozeaxantina-13 (9-*cis* ou 9'-*cis* ou com ácido graxo iso). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

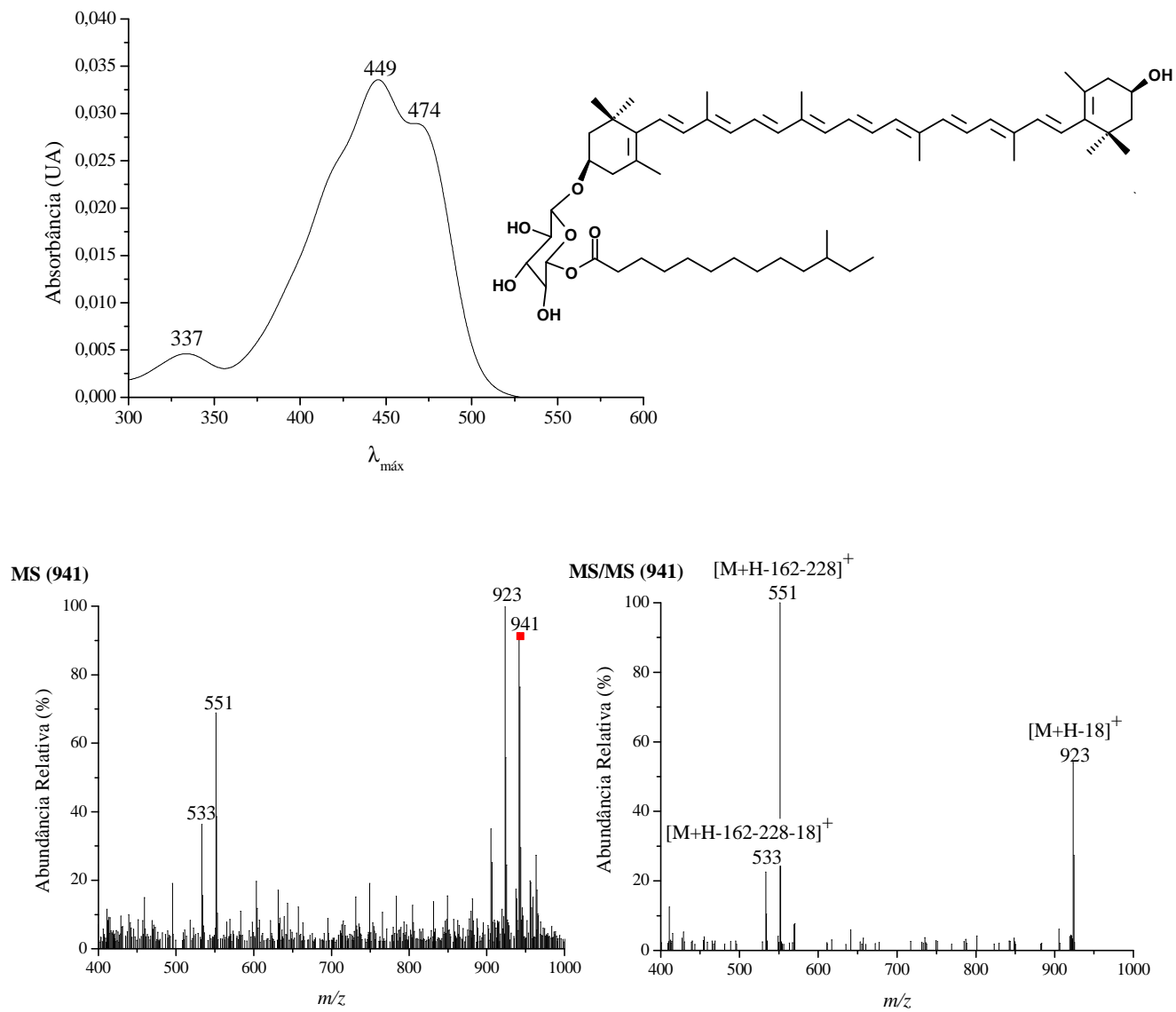


Figura 7: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide termozeaxantina-14. Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

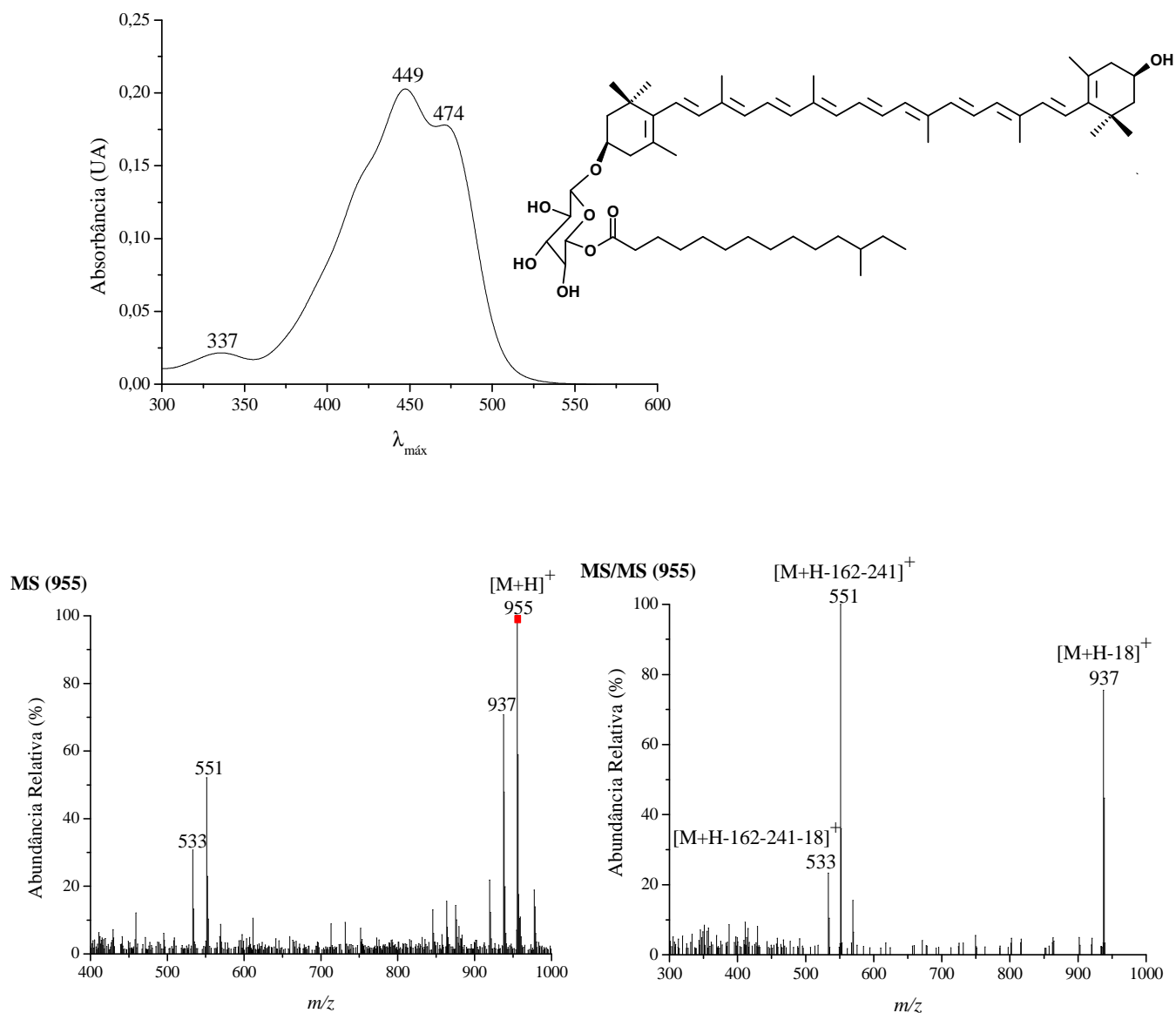


Figura 8: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide termozeaxantina-15. Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.

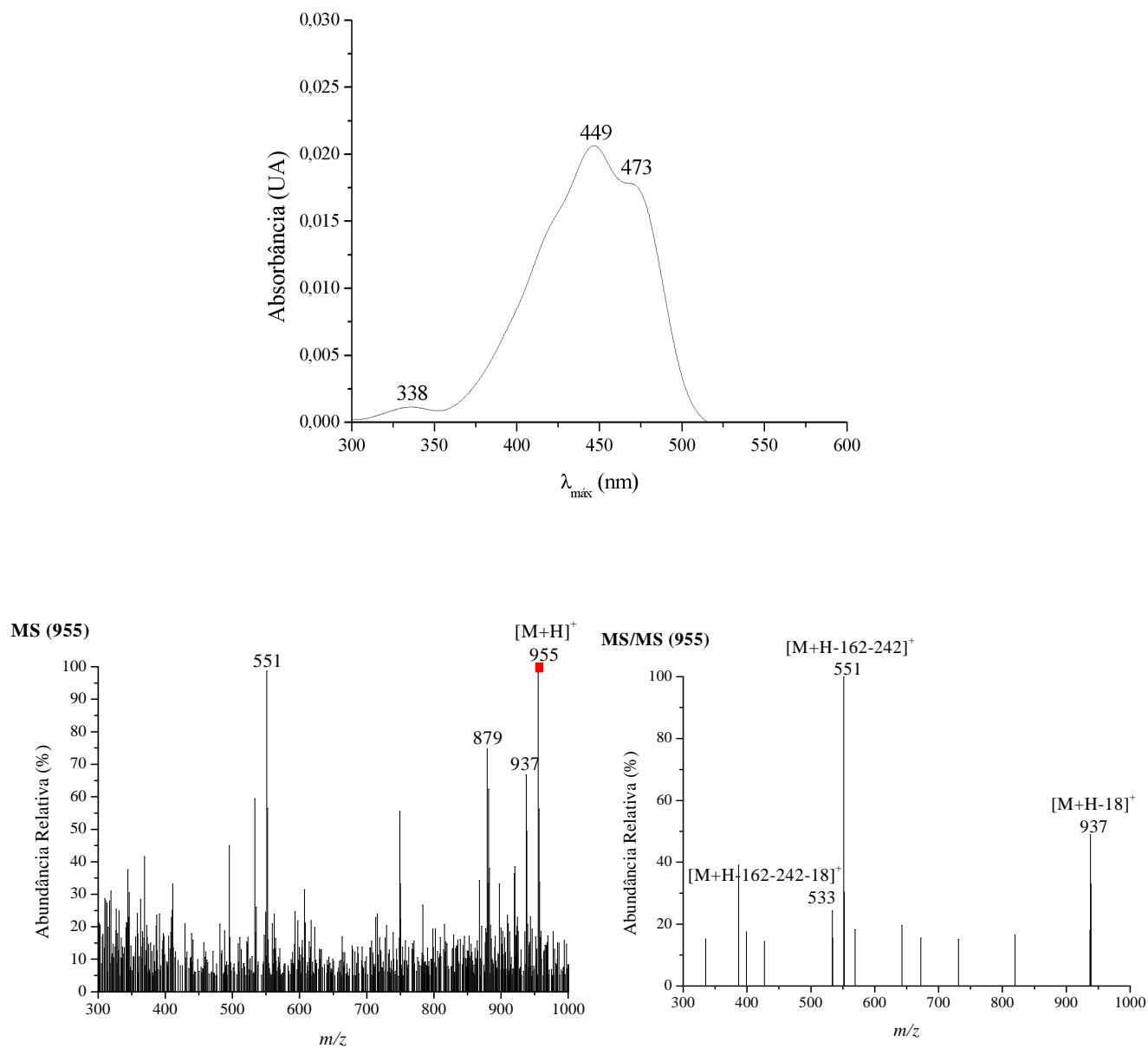


Figura 9: Espectros UV-visível e de massas do carotenoide identificado isômero de termozeaxantina-15 (9'-*cis* ou 9'-*cis* ou com ácido graxo *isso*). Solvente: gradiente linear de metanol/ éter metil *tert*-butílico; fonte de ionização APCI no modo positivo.