



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

Luiz Rodrigo Ito Morioka

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO  
LIPÓICO POR *BACILLUS* SPP, SUA CITOTOXICIDADE E SEU  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

---

Londrina  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUIZ RODRIGO ITO MORIOKA

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO  
LIPÓICO POR *BACILLUS* SPP, SUA CITOTOXICIDADE E SEU  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez

Londrina  
2009

LUIZ RODRIGO ITO MORIOKA

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO  
LIPÓICO POR *BACILLUS* SPP, SUA CITOTOXICIDADE E SEU  
POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Cláudio Takeo Ueno  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Helena da Silva Miglioranza  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Lúcia Luiz Ribeiro  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Regina Georgetti  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009

## **DEDICATÓRIA**

À Deus.

Aos meus pais, Luiz Morioka e Wilma Toshiko Morioka pelo amor e confiança creditados à mim.

Ao meu irmão, Thiago Morioka pelo apoio prestado à realização deste trabalho.

À Paula Nishikawa, pelo amor e respeito recebido durante à realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez, pela oportunidade de orientação desta tese, pela dedicação e a amizade que prevaleceu durante todo o tempo.

Aos professores da banca examinadora, pelas considerações feitas neste trabalho.

Ao professor Dr. Cláudio Takeo Ueno, pela importante ajuda prestada durante a realização da parte prática desta tese.

À Paula Nishikawa pelo respeito e apoio recebido à realização deste trabalho.

Aos professores (as) e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos que direta ou indiretamente proporcionaram a realização deste sonho.

MORIOKA, L.R.I. **Otimização de Parâmetros para a Produção de Ácido Lipóico por *Bacillus* spp, sua Citotoxicidade e seu Potencial Antioxidante.** 2009. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009

## RESUMO

A descoberta contínua de novos metabólitos microbianos que possuem aplicação farmacêutica e em alimentos tem levado ao desenvolvimento de sistemas de cultivo eficientes e de baixo custo. A escolha de um microrganismo apropriado e condições para produção adequadas são fatores cruciais para o processo de recuperação do metabólito. Membros da espécie de *Bacillus* são os procariotos mais freqüentemente usados para produção industrial de metabólitos de interesse. Esses organismos são sobretudo favorecidos pelo fato de que seu cultivo em sistemas de produção em larga escala são de simples operação, porém com certos cuidados e além de um custo não elevado. *Bacillus* spp são bactérias Gram positivas de solo, que secretam numerosas proteínas que degradam uma grande variedade de substratos, possibilitando à bactéria a sobreviver em ambientes que estão em mudança contínua. O *Bacillus* spp sintetiza uma coenzima conhecida como Ácido Lipóico (AL) que é um componente bioativo natural encontrado tanto em membranas celulares bem como, em compartimentos celulares aquosos. Neste estudo, inicialmente foi avaliado o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na concentração de AL na biomassa de *Bacillus* spp e em seguida aplicou-se a técnica de análise de superfície de resposta que definiram as melhores condições de cultivo (temperatura, agitação e concentração de nutrientes). A extração e determinação do ácido lipóico da biomassa do *Bacillus* spp foram determinadas pela técnica preconizada por Kataoka et al., 1993 e Aboul-Enein; Hoenen (2005). A capacidade antioxidante e o mecanismo de ação do AL foi determinada pela capacidade de seqüestro do radical livre estável DPPH\*, a inibição da degradação da deoxirribose por radical hidroxila e a atividade queladora do íon Fe<sup>2+</sup>. A toxicidade do AL foi realizada utilizando a técnica de Mosmann (1983). Verificou-se que a melhor fonte de carbono e de nitrogênio foram glicerol e extrato de levedura, respectivamente. Houve uma máxima concentração de AL quando o *Bacillus* spp foi cultivado em glicerol (25 mg/mL) e extrato de levedura (15 mg/mL) a 30 °C, 150 rpm. Nessas condições de cultivo a concentração obtida de AL apresentou atividade seqüestradora de radicais livres e queladora de íons Fe<sup>2+</sup>. Na avaliação da citotoxicidade do AL os resultados demonstraram que não houve influência na viabilidade celular, apresentado proliferação celular nas diferentes concentrações testadas no tempo de 3 h. Por outro lado, no período de incubação de 24 h observou-se um efeito citotóxico somente nas maiores concentrações de 5.65 a 22.6 µg/mL.

**Palavras-chave:** *Bacillus* spp, Ácido Lipóico, Citotoxicidade, Antioxidante Biológico

MORIOKA, L.R.I. **Parameters Optimization for Lipoic Acid Production by *Bacillus* spp, Cytotoxicity and its Antioxidant Potential.** 2009. Thesis (Doctorate in Science and Food Technology) – “Universidade Estadual de Londrina”, Londrina. 2009

## ABSTRACT

The continual discovery of new microbial metabolites that have application in pharmaceutical and food has led to the development of cultivation systems and efficient low cost. The choice of an appropriate microorganism and suitable conditions for production are crucial to the recovery process of the metabolite. Members of the *Bacillus* species of prokaryotes are the most frequently used for industrial production of metabolites of interest. These organisms are especially favored by the fact that its growth in production systems on a large scale are simple operation, but with some care and also a low cost. *Bacillus* spp are Gram-positive soil bacteria, which secrete many proteins that degrade a wide variety of substrates, allowing the bacteria to survive in environments that are changing continually. *Bacillus* spp synthesize a coenzyme known as Lipoic Acid (LA) which is a natural bioactive component found in both cell membranes and in aqueous cellular compartments. In this study initially evaluated the effect of different sources of carbon and nitrogen concentration of LA on the biomass of *Bacillus* spp and then applying the technique of analyzing the response surface were set the best conditions for growing (temperature, agitation and concentration of nutrients). The extraction and determination of Lipoic Acid biomass of *Bacillus* spp were determined by the technique recommended by Kataoka et al. (1993) and Aboul-Enein; Hoenen (2005). The antioxidant activity and mechanism of action of LA was determined by the sequestration capability of stable free radical DPPH •, inhibition of degradation deoxirribose by hydroxyl radical and chelating activity of Fe<sup>2+</sup> ion. The toxicity of LA was performed using the technique of Mosmann (1983). It was found that the best source of carbon and nitrogen were glycerol and yeast extract, respectively. There was a maximum concentration of AL when the *Bacillus* spp was grown in glycerol (25 mg / mL) and yeast extract (15 mg / mL) at 30 °C, 150 rpm. These culture conditions the LA had an antioxidant activity to fight free radicals, hydroxyl radical and the scavenging of Fe<sup>2+</sup> ions. In assessing the cytotoxicity of LA results showed no influence on cell viability, cell proliferation presented in different concentrations tested in the time of 3 h. Moreover, the incubation period of 24 h showed a cytotoxic effect only at the higher concentration.

**Keywords:** *Bacillus* spp, Lipoic Acid, Cytotoxicity, Biological Antioxidant



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Geral.....	12
2.2. Específicos.....	12
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
3.1. Estudo de Fermentação Microbiana.....	13
3.2. Ácido Lipóico.....	17
3.2.1. Isolamento e Caracterização.....	17
3.2.2. Modelo de Ação.....	18
3.2.3. Determinação e Aplicações.....	20
3.3. Utilização de <i>Bacillus</i> spp no desenvolvimento Biotecnológico.....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. Microrgansimo e Preparo do inoculo.....	24
4.2. Extração do Ácido Lipóico.....	25
4.3. Análise Cromatográfica.....	25
4.4. Determinação da Biomassa.....	26
4.5. Estudo da cinética de crescimento.....	26
4.6. Delineamento Experimental.....	26
4.7. Preparo das Amostras para Avaliação da Citotoxicidade e da Atividade Antioxidante.....	27
4.8. Avaliação da Capacidade Sequestradora do Radical DPPH*.....	28

4.9. Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical Hidroxila.....	28
4.10. Determinação da Atividade Queladora do Íon Fe <sup>2+</sup> .....	29
4.11. Citotoxicidade.....	30
4.12. Análises Estatísticas.....	30
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
6.1. Artigo 1: Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de Ácido Lipóico por <i>Bacillus</i> spp.....	44
6.2. Artigo 2: Culture condition effects on Lipoic Acid biosynthesis by <i>Bacillus</i> sp.....	58
6.3. Artigo 3: Avaliação da atividade antioxidante e citotoxicidade do Ácido Lipóico obtido por <i>Bacillus</i> spp.....	69
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>87</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>88</b>
1. Normas Editoriais para Publicação: Semina.....	88
2. Normas Editoriais para Publicação: Current Microbiology.....	90

## 1. INTRODUÇÃO

Microorganismos são geralmente bem adaptados ao seu meio ambiente. Variações de fatores ambientais ou químicos diretamente relacionados com os microorganismos podem causar diferentes efeitos sobre o crescimento e metabolismo microbiano (SANTOS et al., 2008).

Espécies de *Bacillus* têm sido muito utilizadas em estudos sobre a fermentação industrial, pois apresentam altas taxas de crescimento com curtos ciclos fermentativos, capacidade de secretar proteínas extracelularmente e possuir o status GRAS (Generally Regarded As Safe) junto à Food and Drug Administration para algumas espécies, tais como o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus licheniformis*. Além disso, estudos têm sido registrados sobre a bioquímica, fisiologia e genética de *Bacillus subtilis* entre outras espécies, o que facilita o desenvolvimento de processos de interesse industrial (SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P., 2004).

Na biomassa das espécies de *Bacillus* é sintetizada uma coenzima conhecida como Ácido Lipóico (AL), que também é encontrada em microrganismos eucarióticos, especialmente nas mitocôndrias, (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995; BUSBY et al., 1999) assim como em tecidos de plantas e animais (HERBERT, A.A.; GUEST, J.R., 1975). Sua característica anfipática possibilita sua atuação tanto em membranas celulares lipídicas como em compartimentos celulares aquosos (NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; SGHERRI, C., 2002).

O AL é um composto natural bioativo contendo uma ligação dissulfeto e é quimicamente conhecido por vários nomes, tais como ácido tióctico, DL-6,8 ácido dioctanóico, 1,2-ditiol-3- ácido valérico e 2-ditiol-3 ácido pentanóico. O Ácido Lipóico é uma importante coenzima ligada à proteínas que desempenha um papel fundamental no metabolismo energético celular atuando nos complexos enzimáticos que catalisam a descarboxilação oxidativa dos  $\alpha$ -cetoácidos, como por exemplo o complexo de piruvato desidrogenase (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J.,

1995). A piruvato desidrogenase promove a ligação entre a glicólise e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) no metabolismo energético celular. A Coenzima-A (CoA) formada pela ação do complexo piruvato desidrogenase, pode ser metabolizada no CAT a fim de gerar energia e intermediários para as reações anabólicas ou podendo ser convertido em acetato e excretado do metabolismo (KALE, R.R., 2004).

O AL pode ser utilizado no tratamento de diversas doenças, tais como a diabetes (COLEMAN, M.D.; EASON, R.C.; BAILEY, C.J., 2001; STRODTER et al., 1995; ESTRADA et al., 1996), catarata (OU et al., 1996; MAITRA et al., 1995), doença neurodegenerativa (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995), lesão de isquemia e reperfusão (WOLZ, P.; KRIEGLSTEIN, J., 1996; PANIGRAHI, M.; SADGUNA, Y.; SHIVAKUMAR, B.R., 1996), glaucoma (FILINA et al., 1995), intoxicação por metais pesados (SCOTT et al., 1994; OU, P.; TRITSCHLER, H.J.; WOLFF, S.P., 1995;) assim como no sinergismo de outros antioxidantes, como por exemplo, reciclagem da vitamina C, glutatona e a coenzima Q10 e indireta da vitamina E (NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; SGHERRI, C., 2002). A maioria dos efeitos do AL é devido às suas propriedades antioxidantes, já que sendo um ditiol, é eficaz na proteção contra o estresse oxidativo em virtude de suas duas moléculas de enxofre (ZIYATDINOVA, G.K.; BUDNIKOV, G.K.; POGOREL'TSEV, V.I., 2004).

A atividade antioxidante é um conceito relativo que depende do tipo de estresse oxidativo e do substrato oxidante. De acordo com Packer, L.; Witt, E.H.; Tritschler, H.J. (1995), quando se avalia o potencial antioxidante de um composto, critérios tais como (a) especificidade do radical livre, (b) interação com outros antioxidantes, (c) atividade sequestrante de metais, (d) efeitos na expressão de genes, (e) biodisponibilidade, (f) localização (por exemplo, em meio aquoso ou em membrana), e (g) habilidade em reparar danos oxidativos, têm de ser levadas em consideração.

Nos últimos anos, o potencial como antioxidante do Ácido Lipóico tem sido destacado em vários estudos (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995; BIEWENGA, G.P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A., 1997; COLEMAN, M.D.; EASON, R.C.; BAILEY, C.J., 2001). A primeira etapa crucial na manifestação do potencial de

um antioxidante é a sua absorção e conversão pelo organismo em uma forma útil. O Ácido Lipóico exógeno fornecido para as células bacterianas no meio de cultura é assimilado, reduzido e excretado como ácido dihidrolipóico (DHLA). Tem sido demonstrado que o AL suplementado na dieta é rapidamente absorvido e transportado para os tecidos, incluindo cérebro (PACKER, L.; TRITSCHLER, H.J., 1996), com capacidade de atuar tanto em membrana quanto em ambientes aquosos. Diferente de outros antioxidantes endógenos e exógenos, o AL é um potente sequestrador direto de espécies reativas com capacidade de eliminar radical hidroxila, ácido hipocloroso e radicais de oxigênio singleto, porém não é ativo frente os radicais superóxido e peroxil (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995).

As interações dos parâmetros de cultivo de microrganismos na produção de metabólitos têm sido estudadas por vários pesquisadores (UENO, C.T., 2007; ANGELO, E.A., 2009, QUINTANA, L.R., 2009). Em todos estes estudos se verificou que há uma condição ideal para a produção ou síntese do metabólito microbiano o que resulta em processos mais produtivos favorecendo os custos de produção industrial. Verifica-se na literatura que estudos sobre o efeito dos diversos parâmetros do processo de fermentação na produção AL utilizando *Bacillus* spp não tem sido relatado ainda. Dessa forma, este trabalho visou determinar a influência de diversas fontes de carbono e nitrogênio bem como, da temperatura e agitação sobre a produção de AL utilizando *Bacillus* spp. Além disso, foi avaliado, por diferentes métodos “in vitro”, a atividade antioxidante do AL obtido do meio de cultura otimizado assim como o efeito citotóxico do AL em células CHO-K1.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

Determinar as melhores condições de cultivo do *Bacillus spp* para obter a máxima concentração de Ácido Lipóico na biomassa obtida.

### 2.2. Específicos:

- a) Determinar os efeitos e selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio na produção de AL por *Bacillus spp*;
- b) Determinar os efeitos e selecionar a melhor faixa de temperatura e agitação em função da concentração de AL na biomassa de *Bacillus spp*;
- c) Determinar as melhores condições de cultivo para obter a máxima concentração de AL na biomassa do *Bacillus spp*;
- d) Avaliar o potencial antioxidante e a citotoxicidade do AL extraído da biomassa do *Bacillus spp*;
- e) Determinar o rendimento (g%) de AL presente na biomassa do *Bacillus spp* obtida do cultivo otimizado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Estudo de Fermentação Microbiana

Inicialmente os estudos dos processos fermentativos, mesmo com os grandes avanços na fisiologia microbiana e na biologia molecular, eram descritos de forma empírica. Quando se trabalha com linhagens microbianas que são recém isoladas ou taxonomicamente indefinidas, abordagens empíricas das condições fermentativas eram as únicas opções disponíveis (MADDOX, I.S.; REICHERT, S.H., 1977; GREASHAM, R.; INAMINE, E., 1986).

Na maioria dos casos, a fermentação começa com algum meio e certas condições de cultivo que permitem a expressão, no mínimo, modesta do metabólito de interesse. O passo seguinte é aumentar a expressão a um nível suficiente para o isolamento e caracterização do produto desejado (DEMAIN et al., 1999). Experimentos preliminares normalmente são realizados a fim de minimizar tempo e custo envolvido no estudo das variáveis nutricionais, não nutricionais e físicas para a fermentação comercial (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Variáveis nutricionais importantes em fermentação comercial

Variáveis	Faixa da variável (% p/v)	Exemplos
Fonte de carbono	0.5 – 20	Glicose, sacarose, amido, melaço, dextrina, glicerol, lipóideos
Fonte de nitrogênio	0.1 – 10	Gás amônia, sais de amônio, caseína hidrolisada, ácido glutâmico, nitratos, peptonas, uréia, extrato de levedura
Fósforos	0.1 – 2	Fosfatos
Sulfurosos	0.1 – 1	Metionina, proteínas, sulfatos
Outros nutrientes	< 1	Sais de ferro, magnésio, oxigênio, potássio, vitaminas, elementos traços

DEMAIN et al. (1999)

O estudo do processo fermentativo pode começar medindo-se o rendimento do produto como resposta a fatores tais como composição nutricional do meio, temperatura de incubação, agitação e tempo de fermentação. É comum substituir no início do estágio de desenvolvimento a fonte original de carbono e nitrogênio por outra fonte amplamente usada (ZABRISKIE et al., 1980).

**Tabela 2.** Fatores físicos e outros fatores não nutricionais importantes em fermentação comercial

<b>Fator</b>	<b>Faixa do fator</b>
Temperatura	10 – 60 °C
pH	3 – 9
Agitação	50 – 500 rpm
Aeração	0.1 – 2 vvm
Pressão	1 – 15 lb
Tamanho do inóculo	1 – 15 % (vol/vol)
Tempo de fermentação	0.8 – 14 dias

Vvm, volume de ar por volume do meio líquido por minuto. DEMAINE et al. (1999)

Estudos de fermentação são muitas vezes feitos utilizando métodos clássicos alterando um fator de cada vez, enquanto todos os outros são mantidos constantes (GREASHAM, R.; INAMINE, E., 1986; STROBEL, R.J.; NAKATSUKA, W.M., 1993; CHEM, H.C., 1994). Técnicas de delineamentos experimentais apresentam alternativas mais balanceadas do que o método clássico de alterar um fator de cada vez. Por exemplo, ao invés de testar fontes de carbono e nitrogênio em dois experimentos separados, poderia variar combinações simultâneas destes nutrientes, obtendo assim informações mais relevantes ao estudo (BOX, G.E.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S., 1978; BOX, G.E.; DRAPER, N.R., 1987; HAALAND, P.D., 1989, MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C., 1995).

Nos últimos anos, delineamentos experimentais utilizados para o estudo de processos fermentativos seguem um procedimento seqüencial (BOX, G.E.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. 1978; HAALAND P.D., 1989; DEMAINE et al., 1999). A primeira etapa consiste em realizar um estudo de contraste em dois níveis (-1, +1) dos fatores de interesse, por meio de delineamentos fatoriais completos ou fatoriais fracionados, a fim de obter os efeitos principais que influenciam de forma positiva ou negativa a resposta do sistema. A faixa de variação dos parâmetros escolhidos deve



causar um efeito na resposta do sistema, deve evitar inibição do crescimento do microrganismo em estudo e deve contemplar a concentração ótima necessária para uma melhor resposta. Por exemplo, num primeiro momento, fatores qualitativos ou não-numéricos (exemplo: glicerol versus extrato de levedura) são obtidos, com o auxílio da literatura, para determinar quais condições nutricionais e físicas são as mais favoráveis para otimizar o processo fermentativo. Então, os fatores significativo-negativos ou não significativo-negativos podem ser eliminados, deixando somente os fatores significativo-positivos ou não significativo-positivos, que são os que realmente afetam a resposta do sistema, para o estudo de otimização do processo fermentativo aplicando um Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). (TANG et al., 2004)

O DFF pode ser utilizado como alternativa quando o número de corridas para um delineamento fatorial completo é muito extenso para ser praticado (WANG, J.; WAN, W., 2009). A utilidade do delineamento fatorial fracionado é baseada na idéia de que os efeitos principais e interações entre dois fatores são inicialmente os efeitos mais importantes para a modelagem e compreensão do processo multifatorial (STROBEL, R.J.; SULLIVAN, G.R., 1999). Embora a interação entre dois fatores seja comum e possuam um papel importante no processo de otimização, não é sempre necessário estimá-los num estudo de contraste de variáveis. Uma vez que fatores críticos foram identificados por meio do estudo de contraste, o investigador pode avançar para a fase de otimização do planejamento experimental (DEMAIN et al., 1999). Informações do estudo de contraste devem ser usadas para corrigir determinadas faixas dos fatores e eventualmente de rever o espaço experimental dos fatores críticos no delineamento estatístico (DEMAIN et al., 1999).

A MSR foi desenvolvida por Box e colaboradores na década de 50 (GILMOUR, S.G., 2006; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; NETO, B.B., 2006) e consiste de um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de modelos empíricos com os dados experimentais obtidos em relação ao delineamento experimental (VENTER G., 1998). Com esse objetivo, funções polinomiais lineares ou quadráticas são empregadas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, para explorar (modelagem e deslocamento) condições experimentais até sua otimização (DEMAIN et al., 1999).

A aplicação mais extensa da metodologia de superfície de resposta pode ser encontrada na otimização da composição de meios de cultivo e condições de operação em muitos bioprocessos (BAZARAA, W.A.; HASSAN, E.E., 1996; LEE, S.; CHEN, W., 1997; PURI, S.; BEG, Q.K.; GUPTA, R., 2002; TANG et al., 2004; CAO et al., 2008; SHARMA, P.; SINGHA, L.; DILBAGHI, N., 2009).

Segundo Demain et al. (1999) os objetivos do estudo através de delineamento estatístico por MSR são (i) confirmar os efeitos em experimentos anteriores e suas interações, (ii) estimar a curvatura e os efeitos quadráticos e (iii) determinar faixas ótimas para os fatores críticos. Uma vez que os fatores foram reduzidos a um número razoável (entre dois a cinco), o primeiro objetivo (i) pode ser realizado através de delineamento fatorial. Após a determinação dos fatores que influenciam na resposta, as condições ótimas de operação podem ser estabelecidas através de delineamentos experimentais mais complexos como, por exemplo, o delineamento de Box-Behnken.

O delineamento de Box-Behnken é um delineamento fatorial fracionado de segunda ordem em três níveis desenvolvido por Box and Behnken (BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W., 1960; FERREIRA et al., 2007; BEZERRA et al., 2008; WANG, J.; WAN, W., 2009). O delineamento experimental pode ser visto como uma combinação de delineamento fatorial em dois níveis com delineamento de blocos incompleto sendo que, em cada bloco, certo número de fatores é inserido em todas as combinações possíveis no delineamento, enquanto outros fatores são mantidos em níveis centrais (WANG, J.; WAN, W., 2009). No delineamento de Box-Behnken, os pontos experimentais estão localizados em uma hiperesfera eqüidistante do ponto central. Segundo Ferreira et al. (2007), suas principais características são:

(1) a exigência de um número experimental de acordo com  $N = 2k(k-1) + cp$ , onde  $k$  é o número de fatores e  $(cp)$  é o número de pontos centrais;

(2) de que todos os fatores em estudo devem ser ajustados somente em três níveis (-1, 0, +1) com intervalos eqüidistantes entre esses níveis.

O delineamento de Box-Behnken fornece uma alternativa econômica, pois possui menos fatores que outros delineamentos e não contém níveis muito elevados ou muito baixos. Cao et al. (2008) aplicaram métodos estatísticos para otimizar as condições de cultura para a produção de xilanase em fermentação submersa. Wang et al. (2009) aplicaram o delineamento de Box-Behnken para examinar o efeito das condições de cultivo sobre a produção de violaceína por *Duganella* sp. B2.

A superfície de contorno gerada pelo delineamento de Box-Behnken mostra visualmente a resposta em uma região em que os níveis dos fatores podem indicar quão sensíveis é a resposta frente às mudanças de níveis de cada fator e em que medida a interação de fatores afetam a resposta, a fim de determinar a região ótima para a obtenção da máxima resposta (WANG, J.; WAN, W., 2009).

## **3.2. Ácido Lipóico**

### **3.2.1. Isolamento e Caracterização**

Os trabalhos sobre AL tiveram início com Lester J. Reed na década dos anos 50, em estudos relacionados ao isolamento de um fator que substituíria o acetato no meio de crescimento de certas bactérias lácticas (SNELL, E.E.; STRONG, F.M.; PETERSON, W.H., 1937). Ficou comprovado na época que este fator era amplamente distribuído nos animais, vegetais e nas células microbianas, sendo o fígado dos animais uma fonte bastante rica (REED et al., 1951). Tal fator era estreitamente ligado à proteína do fígado e é liberado somente após hidrólise com ácido ou base (REED, L.J., 1957). Em 1949, empresas farmacêuticas processavam grandes quantidades de carne de porco e fígado bovino para obter extratos adequados para o tratamento da anemia perniciosa (REED, L.J., 1998). Fígado fresco era macerado com água morna e as proteínas residuais e o material gorduroso eram secos e vendidos como um complemento da alimentação animal. Foram realizados acordos com a Companhia Eli Lilly para a obtenção de resíduos de fígado e desenvolvimento de procedimentos para extração e purificação do fator substituinte do acetato (REED, L.J., 1998).

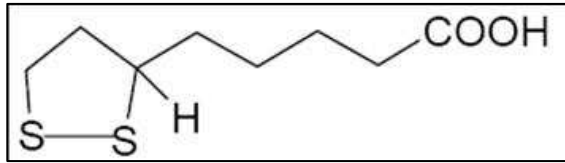
No final dos anos 1940 e 1950, vários outros grupos tentaram isolar fatores semelhantes ao fator substituinte do acetato (REED, L.J.,1998). Esses fatores incluíam o fator de oxidação do piruvato que era necessário para a oxidação do piruvato em acetato e o dióxido de carbono por *Streptococcus faecalis* (O'KANE, D.E.; GUNSALUS, I.C., 1947).

Em 1950 foi realizada uma colaboração com o Laboratório de Pesquisa Eli Lilly para isolar o fator substituinte do acetato/fator de oxidação do piruvato (REED, L.J., 1998). O grupo Eli Lilly adaptou e ampliou procedimentos de isolamento a fim de concentrar o fator de crescimento (0,1 % a 1 % puro) para análises posteriores. Em 1951, Reed obteve a primeira amostra do fator (300 mg de cristais amarelos), que foi caracterizado parcialmente e dado o nome trivial de ácido lipóico (REED et al., 1951). Espectrofotômetros de Ressonância Magnética Nuclear bem como, espectrômetros de massa, não eram disponíveis naquela época, mas foi possível estabelecer que o AL fosse 6,8-ácido ditioctanóico,5,8-ácido ditioctanóico ou 4,8-ácido ditioctanóico. Posteriormente, a estrutura correta, 6,8-ácido ditioctanóico foi estabelecida através de estudos da síntese do ácido DL-lipóico (REED, L.J., 1957).

Atualmente o AL pode ser extraído e encontrado em fontes vegetais como o espinafre, brócolis e tomate assim como em fontes animais como rim, coração e fígado (LODGE et al., 1997). Kataoka, H.; Hirabayashi, N.; Makita, M. (1993) também verificaram a presença de AL em alimentos, diversos tecidos de órgãos e em vários gêneros de células bacterianas.

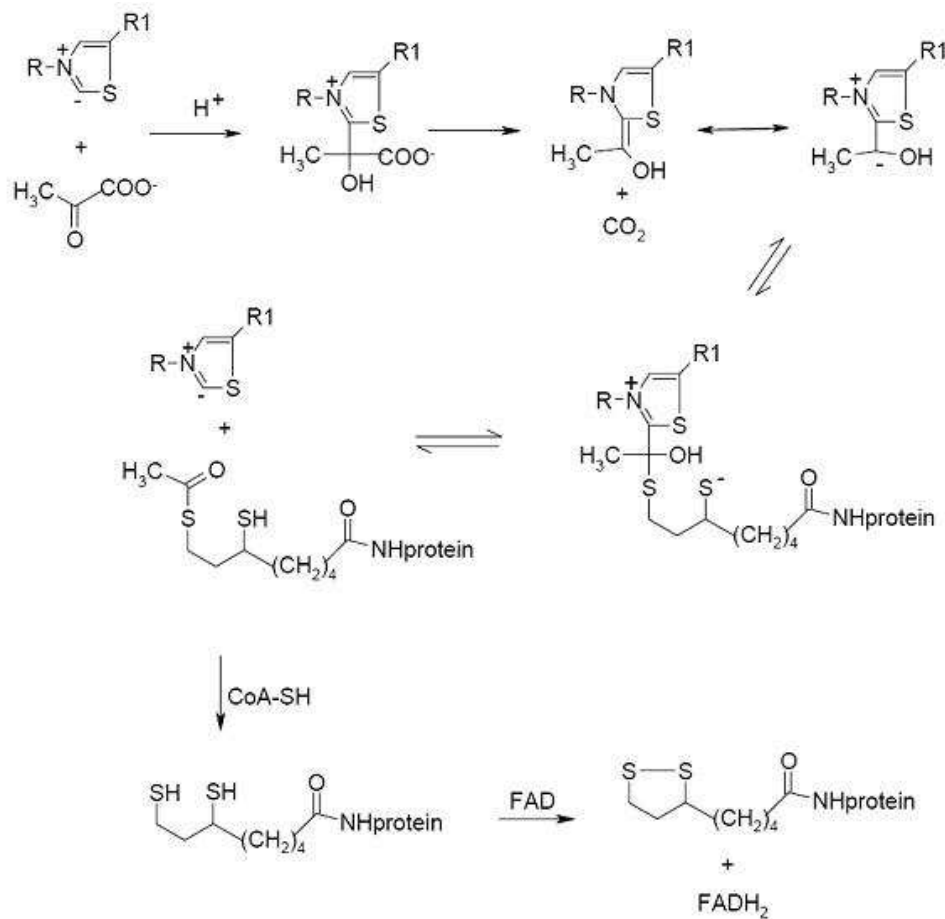
### **3.2.2. Mecanismo de Ação**

O AL é um importante componente bioativo ligado à proteína e também um fator de crescimento encontrado em tecidos vegetais e animais, bem como em microorganismos (GUIRARD, B.M.; SNELL, E.E.; WILLIAMS, R.J., 1946; REIO, L., 1960). Trata-se de um composto dissulfeto com oito átomos de carbono (Figura 1). É reconhecido como um cofator essencial para os complexos multienzimáticos que catalisam a descarboxilação oxidativa de  $\alpha$ -cetoácidos como, por exemplo, o piruvato e  $\alpha$ -cetogluturato (SCHMIDT et al., 1969).



**Figura 1.** Estrutura do Ácido Lipóico

A oxidação completa do piruvato durante a glicólise aeróbia ocorre no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) (NELSON, D.L.; COX, M.M., 2002). O piruvato sofre descarboxilação oxidativa antes de entrar no ciclo CAT (KALE, R.R., 2004), conforme Figura 2.



**Figura 2.** Mecanismo de ação biológica do Ácido Lipóico

As coenzimas necessárias ao complexo de piruvato desidrogenase para a descarboxilação oxidativa do piruvato são tiamina pirofosfato (TPP), nicotinamida

adenina dinucleotídeo (NAD), Ácido Lipóico, coenzima A e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (REED et al., 1958).

Segundo Kale, R.R. (2004), a tiamina pirofosfato interage com o ácido lipóico para formar um complexo adicional que, subseqüentemente, é clivado para formar o complexo acil-Ácido Lipóico e o TPP é regenerado. O grupo acetil, agora como um tioéster, é transferido a partir do acil-ácido lipóico à coenzima-A para formar acil-CoA pelo sistema enzimático de transferência de grupos acetil. Finalmente, a molécula reduzida do Ácido Lipóico é reoxidada pela interação com a FAD e o ciclo se completa. O acil-CoA em seguida entra no ciclo CAT e a FAD é regenerada pela interação com  $\text{NAD}^+$  no sistema de transporte de elétrons.

As reações do sistema enzimático de transferência de grupos acetil envolvem três enzimas: a enzima E1, exigindo a vitamina tiamina que catalisa a descarboxilação oxidativa do substrato; a enzima E2, que contém lipoamida, um derivado do Ácido Lipóico, que catalisa a transferência do grupo acil do grupo acil-ácido lipóico para CoA, formando acil-CoA e a enzima E3, que reoxida a fração reduzida do ácido lipóico da enzima E2 (PACKER, L.; TRITSCHLER, H.J., 1996).

### **3.2.3. Determinação e Aplicações**

A determinação do Ácido Lipóico presente em microrganismos ou em amostras de alimentos é importante para estudos bioquímicos, nutricionais e farmacêuticos. O AL existe nas formas livre ou ligada à proteína e na forma reduzida ou oxidada (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995).

Devido à sua importância na área farmacológica e na área médica, o AL tem sido visto como um agente promissor no uso terapêutico estimulando dessa forma a investigação para o desenvolvimento de métodos precisos para sua determinação quantitativa (BILSKA, A.; WLODEK, L., 2005). Ensaio microbiológico (HERBERT, A.A.; GUEST, J.R., 1970), imunoensaio enzimático (MACLEAN, A.I.; BACHAS, L.G., 1991) e métodos espectrofotométricos (SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L., 1994) têm sido registrados para a determinação e quantificação do AL.

Uma revisão de métodos cromatográficos foi realizada por Kataoka, H. (1998) e uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi reportada por ABOUL-ENEIN, H.Y.; HOENEN, H. (2005).

Como a maioria do Ácido Lipóico presente em amostras biológicas está ligada a uma proteína através de uma ligação amida ao grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo de lisina (SCHMIDT et al., 1969; KOIKE, M.; REED, L.J.; CARROLL, W.R., 1960; KOCHI, H.; KIKUCHI, G., 1976), há necessidade de realizar uma hidrólise para sua liberação. White, R.H. (1980; 1981), Pratt et al. (1989) e Vianey-Liaud et al. (1994) hidrolisaram a amostra utilizando HCl (6M) a 120 °C por 2 - 4 horas e em seguida o AL liberado foi extraído com diclorometano. KATAOKA, H.; HIRABAYASHI, N.; MAKITA, M. (1993; 1997) realizaram uma hidrólise básica para liberar o AL das amostras, uma vez que a degradação do AL durante a hidrólise básica foi menor do que quando utilizada a hidrólise ácida. Neste método, as condições ótimas para a hidrólise foram 110 °C por 3 horas em solução de hidróxido de potássio 2 M contendo 4% soro albumina bovina (SAB) para evitar a degradação do AL durante a hidrólise. Semelhante à hidrólise ácida, o AL liberado foi extraído com diclorometano para posterior análise cromatográfica.

Há mais de cinquenta anos que pesquisas com o AL tem demonstrado suas propriedades fisiológicas e farmacológicas bastante significativas (GUIRARD, B.M.; SNELL, E.E.; WILLIAMS, R.J., 1946), devido à sua ação por múltiplos mecanismos, o AL vem sendo utilizado no tratamento de diversas doenças. No tratamento de pacientes com AIDS o Ácido Lipóico inibe a replicação do vírus HIV-1 em culturas de células-T linfóides (BAUR et al., 1991). Nas doenças neurodegenerativas o AL tem atuado como quelante de metais de transição livres, na captura de radicais hidroxila, superóxidos e peróxidos (SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L., 1991; KAGAN et al., 1992a; DEVASAGAYAM et al., 1993). Em distúrbio hepático alcoólico, a base para o tratamento está relacionada ao papel metabólico do Ácido Lipóico e não nas propriedades antioxidantes. Há um aumento significativo na atividade da aspartato transaminase e transpeptidase em pacientes que se abstiveram do álcool (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995). No tratamento de intoxicações por metais pesados, o AL é utilizado por suas características quelantes e antioxidantes (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995). No tratamento de glaucoma, a

administração de altas doses do Ácido Lipóico está associada a um aumento na atividade da gama glutamil-transpeptidase relacionando-se com a melhora no tratamento (FILINA et al., 1995). O AL inibe a aldose redutase que em altos níveis de atividade foi associada com catarata diabética em ratos (OU et al., 1996). Na doença de isquemia e reperfusão, Wolz, P.; Krieglstein, J. (1996) sugeriram que o AL deve ser reduzido para ácido diidrolipóico, que é o responsável pela neuroproteção. No tratamento do diabetes, o AL apresenta um efeito positivo na liberação da insulina, estimulando a captação de glicose pelas células (WAGH, S.S.; NATRAJ, C.V.; MENON, K.K.G., 1987; STRODTER et al., 1995; ESTRADA et al., 1996; COLEMAN, M.D.; EASON, R.C.; BAILEY, C.J., 2001). Na doença de Alzheimer, o AL aumenta a produção de acetilcolina (ACh) A, pela ativação da colina acetiltransferase aumentando assim, a captação de glicose e fornecendo assim mais acetil-CoA para a produção de acetilcolina (HOLMQUIST et al., 2006). Também o AL pode ser usado como constituinte em suplementos e preparações cosméticas, como por exemplo, em loções, pomadas e cremes para a pele (SEGALL et al., 2004; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; GOHLA, S., 2005).

A maioria dos efeitos biológicos do Ácido Lipóico está relacionada às suas propriedades antioxidantes, caracterizando-se por apresentar baixa toxicidade, facilidade de absorção nos alimentos, boa conversão para uma forma utilizável em células e tecidos e versatilidade atuando tanto nas fases aquosas como em membranas. Com sua propriedade anfipática o AL tem a capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROS) radicalares e não radicalares, inibir os geradores de EROS e interagir com outros antioxidantes (PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J., 1995; PACKER, L.; TRITSCHLER, H.J., 1996; NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; SGHERRI, C., 2002; LI et al., 2004).

### **3.3. Utilização de *Bacillus* spp no Desenvolvimento Biotecnológico**

Há cerca de duas décadas, uma grande quantidade de informação sobre a bioquímica, fisiologia e genética foi adquirida sobre o gênero *Bacillus*, o que facilitou



o desenvolvimento e uma maior exploração destes microrganismos nos processos biotecnológicos (SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P., 2004).

Espécies do gênero *Bacillus* são bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram-positiva, formadoras de esporos, encontradas no solo, com capacidade de usar diversos substratos devido ao amplo complexo enzimático que possuem. São conhecidas por sua eficiente atividade metabólica e adaptabilidade a diferentes condições ambientais bem como por suas altas taxas de crescimento com curtos ciclos de fermentação e boa capacidade para secretar proteínas/enzimas no meio extracelular que, somados ao status GRAS (generally regarded as safe) junto ao Food and Drug Administration (FDA) fornecem para espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* um grande potencial de aplicação em processos biotecnológicos (SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P., 2004; WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J., 2004).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido direcionados para a exploração de diferentes condições metabólicas em diversas aplicações biotecnológicas utilizando-se espécies do gênero *Bacillus*. Assim, Vidaurre, T.J.C. (1996) realizou estudos para a otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento de uma nova linhagem de *Bacillus thuringiensis*. Payot, T.; Chemaly, Z.; Fick, M. (1999) realizaram estudos para otimizar a produção de ácido láctico utilizando o *Bacillus coagulans*. Yazgan et al.(2001) estudaram a produção do antibiótico Bacilisina produzida por *Bacillus subtilis*. Soares, E.A. (2002) otimizou a produção de metabolitos antifungicos de *Bacillus subtilis* para inibir *Botrytis cinerea*. Itano, F.H. (2006) otimizou a produção de quitinases utilizando *Bacillus* spp DP4. Ernandes, F.M.P.G. (2006) estudou a produção de levana utilizando *Bacillus subtilis*. Ângelo, E.A. (2009) otimizou um meio de cultura para a produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* HD537, por fermentação submersa descontínua, utilizando resíduos agroindustriais, com o intuito de controlar populações de *Aedes aegypti*. Quintana, L.R. (2009) estudou a produção de quitoligossacarídeos fermentando a farinha de crisálida com uma estirpe de *Bacillus* spp DP4 para ser utilizado como ingrediente na formulação de ração para aves.

Verifica-se que espécies de *Bacillus* apresentam um grande potencial na produção de uma variedade de metabólitos secundários com ampla aplicação na área farmacêutica e de alimentos. Assim, este potencial de metabólitos bioativos do *Bacillus* motiva a realização de estudos e pesquisas sobre a produção de componentes naturais abordando aspectos pouco estudados que relacionam as condições de cultivo, fisiologia e a síntese destas biomoléculas, visando sua futura aplicação.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Microrgansimo e Preparo do Inóculo**

*Bacillus* spp foi obtido do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, e mantida a 5°C em meio Agar Brain Hearth Infusion (ABHI) inclinado.

A bactéria foi cultivada em caldo Brain Hearth Infusion (BHI) sob agitação (120 rpm) a 32°C durante 24 horas. Após este período, 1.0 mL desta cultura foram inoculados em 50 mL do caldo BHI estéril e incubado por mais 24 horas na mesma condição de cultivo. Então, esta cultura foi diluída em solução salina (0.85%) para obter uma concentração de  $3.0 \times 10^8$  células/mL de acordo com o padrão McFarland N°1 (MC FADDIN, J.F., 1980). Uma alíquota de 0.1 mL da suspensão celular (inóculo inicial) foi inoculado assepticamente em 25 mL de meio estéril contido nos frascos experimentais (Erlenmeyers de 250 mL de capacidade) e incubado sob agitação de 120 rpm a 32°C por 24 horas.

## 4.2. Extração do Ácido Lipóico

Após as 24 horas de cultivo, sob as condições descritas anteriormente, a cultura foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos e em seguida a biomassa foi lavada com solução salina (0.85%). Para a extração do AL bacteriano, 0.10 g de biomassa foi colocada em tubo de centrífuga de polipropileno (15 mL) no qual foram adicionados 1.60 mL de solução de soro albumina bovina (50.0 mg/mL) em KOH 2.50 M e 0.40 mL de água destilada. As amostras foram hidrolisadas por 3 horas a 100°C sob vácuo. Ao hidrolisado resfriado, foi adicionado de 0.10 mL de 2-mercaptoetanol (solução a 1.0 mg/mL) e 0.80 mL de HCl 6 M. O Ácido Lipóico contido nessa solução foi extraído com 4,0 mL de diclorometano e o extrato obtido (camada inferior) foi evaporado com gás N<sub>2</sub> (KATAOKA, H., 1998).

## 4.3. Análise Cromatográfica

Para a análise cromatográfica por CLAE o extrato obtido foi dissolvido em 1.0 mL de NaOH 0.010 M e injetado no aparelho cromatográfico. A determinação de AL foi realizada utilizando a técnica preconizada por Aboul-Enein, H.Y.; Hoenen, H. (2005) com as seguintes modificações: foram utilizados, bomba LC – 10AD (Shimadzu); detector UV-VIS SPD-10A (Shimadzu) ajustado para 332 nm; degaseificador DGU-2A (Shimadzu); injetor de amostra manual (Shimadzu); coluna de fase reversa Ace 5 C18 column (25 cm X 4.6 mm id). A fase móvel consistiu-se de acetonitrila : água (65:35 v/v). O fluxo usado foi de 1.0 mL/minuto. Para avaliação dos dados obtidos, foi utilizado o programa computacional Class-CR10 (Shimadzu).

Para a curva de calibração, uma solução estoque padrão de Ácido Lipóico de 0.10 mol L<sup>-1</sup> foi preparado dissolvendo 2.06 g de AL (Sigma) em 5.0 mL de 0.10 mol L<sup>-1</sup> de solução de NaOH e completado com tampão Tris-HCl (pH = 8.5) para um volume de 100 mL. A partir desta solução estoque foram preparadas diluições para obtenção das concentrações de 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> e 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> de AL (ABBAS, M.N.; RADWAN, A.A., 2007).

#### 4.4. Determinação da Biomassa

A determinação da concentração de biomassa (peso seco) no estudo da cinética foi através do método gravimétrico. Para isso, uma alíquota de 4.0 mL da cultura foi centrifugada a 4500 x g a 10°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 4.0 mL de solução de cloreto de sódio (0.85%) e centrifugado novamente. O precipitado da segunda centrifugação foi ressuspenso em 4.0 mL da solução salina (0.85%). Alíquotas de 1.0 mL foram transferidas para cadinhos previamente tarados, os quais foram armazenados em estufa à 105 °C, até peso constante.

#### 4.5. Estudo da Cinética de Crescimento

Foi realizada uma curva de crescimento para o *Bacillus* spp no meio otimizado a fim de verificar a relação entre a concentração de Ácido Lipóico e biomassa. A cultura de células foi inoculada no meio de cultura com as fontes otimizadas conforme descrito no item 4.1. Em intervalos predeterminados, foram retiradas alíquotas da cultura para análise de biomassa (gravimetria) e determinação da concentração de Ácido Lipóico.

#### 4.6. Delineamento Experimental

O delineamento fatorial fracionado em dois níveis  $2^{8-4}$  foi utilizado para avaliar a composição do substrato que tenham influência sobre a concentração de Ácido Lipóico na biomassa de *Bacillus* spp. Este delineamento experimental possibilita a triagem de várias variáveis, permitindo o estudo dos efeitos com um número reduzido de experimentos. Oito variáveis foram escolhidas neste trabalho (A) farinha de crisálida, (B) melaço, (C) glicose, (D) glicerol, (E) peptona, (F) extrato de levedura, (G) fosfato de amônio e (H) sulfato de amônio. As condições de cultivo foram conforme item 4.1. O delineamento experimental para varredura das variáveis é mostrado na Tabela 1 (ver artigo 1). Por convenção, o delineamento estatístico é

expresso nos valores codificados, sendo as variáveis designadas como -1 (nível mínimo) e +1 (nível máximo). O delineamento experimental e a análise estatística dos dados foram conduzidos com o programa computacional Statistic 6.0 Statsoft 2001.

Os efeitos das condições de cultivo na síntese do AL na biomassa de *Bacillus* spp, inicialmente foram estudados usando dois planejamentos fatoriais fracionários com três níveis  $3^{(3-1)}$ . Os parâmetros definidos com os níveis utilizados no primeiro e segundo experimentos são apresentados na Tabela 1 e 2, respectivamente (ver artigo 2). Para definir a concentração ideal de glicerol e de extrato de levedura que permitiu ao *Bacillus* spp sintetizar a máxima concentração de AL na sua biomassa, foi aplicado o delineamento de Box-Behnken (BOX, G.E.P.; Behnken, D.W., 1960). Todos os experimentos foram analisados pelo software, Estatística 6,0. utilizando a concentração de AL, após 24 h de fermentação, como resposta.

#### **4.7. Preparo das Amostras para Avaliação da Citotoxicidade e da Atividade Antioxidante**

Para o estudo da citotoxicidade, células epiteliais de ramster chinês (CHO-K1) foram tratadas com o Ácido Lipóico, diluído em água:etanol (1:1) com obtenção de concentrações finais no meio reacional de 0.05, 0.09, 0.12, 0.15, 0.23, 0.46, 0.57, 0.92, 1.13, 2.26, 2.3, 4.6, 5.65, 11.3 e 22.6  $\mu\text{g/mL}$  com oito replicatas por tratamento.

Para o estudo da Atividade Antioxidante, o AL, em triplicatas, foi diluído em etanol com obtenção de concentrações finais no meio reacional de 1.40, 2.80, 5.60, 9.80, 14.00, 19.60 e 28.00  $\mu\text{g/mL}$  e 0.49, 0.98, 1.63, 2.45, 3.34 e 4.9  $\text{mg/mL}$  para os ensaio de DPPH<sup>\*</sup> e batofenantrolina, respectivamente, enquanto que para o ensaio de deoxirribose a amostra foi diluída em NaOH 0.01M obtendo-se como concentrações finais: 0.34, 0.67, 1.34, 2.68 e 4.9  $\text{mg/mL}$ .

#### 4.8. Avaliação da Capacidade Sequestradora do Radical DPPH\*

A atividade antioxidante de diferentes concentrações de AL foi determinada pela capacidade doadora de elétrons ao radical livre estável DPPH\* (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BLOIS, M.S., 1958). Foram misturados em tubo de ensaio 1.0 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5.5, 1.0 mL de etanol, 0.5 mL de solução etanólica de DPPH\* 250 µM e 100 µL das amostras. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos e a redução do DPPH\* foi monitorada pelo decréscimo da absorvância em 517 nm. O controle positivo não continha AL. A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade doadora de elétrons ao radical DPPH\* pelo AL e estimada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de Atividade antioxidante} = 100 - (100 A_a / A_0) \quad (1)$$

onde,  $A_a$  é a absorvância da amostra e  $A_0$  é a absorvância do controle positivo. O valor de  $IC_{50}$  é definido com a concentração final, em µg/mL das amostras presente na cubeta, necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH\* em 50%.

#### 4.9. Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical Hidroxila

A eficiência do AL no sequestro do radical hidroxila foi avaliada pela degradação da deoxirribose como descrito por Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I. (1987), com algumas modificações. Foram misturados em tubos de ensaios 1.0 mL de tampão  $KH_2PO_4$ -KOH (20 mM, pH 7.4), 10 µL de ascorbato (100 µM), 10 µL de diferentes concentrações de AL, 10 µL de deoxirribose (2,8 mM), 10 µL de  $H_2O_2$  (1 mM), 10 µL de Fe – EDTA ( $FeCl_3$  50 µM, EDTA 52 µM). Os tubos, contendo a mistura de reação, foram incubados a 37 °C por 30 min. Após este período, 1.0 mL de ácido tiobarbitúrico (1% em NaOH 50 mM), 100 µL de NaOH (10 M) e 500 µL de  $H_3PO_4$  (20%) foram adicionados aos tubos e os mesmos foram incubados a 80 °C por 20 minutos e a absorvância lida em 535 nm (ARUOMA, O.I., 1994; SCHINELLA et al., 2000). No ensaio, ocorreram as seguintes reações:



A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi avaliada, principalmente, como MDA devido à degradação de deoxirribose causada pelo radical hidroxila. A medida foi realizada em 535 nm a temperatura ambiente. Foram feitos o branco (ausência de deoxirribose) e o controle positivo (ausência de AL). Assim, a atividade antioxidante do AL foi expressa como % de inibição da formação do complexo MDA-TBA pelo seqüestro do radical hidroxila e estimada similarmente à Equação (1).

#### 4.10. Determinação da Atividade Queladora do Íon $\text{Fe}^{2+}$

A atividade queladora do íon  $\text{Fe}^{2+}$  pelo AL foi determinada com o ensaio de batofenantrolina (BPS) (BOLANM, B.J.; ULVIK, R.J., 1987). Foram misturados em tubo de ensaio, 2.0 mL do meio de reação (KCl, 130 mM; Tris-HCl, 10 mM; pH 7.4), 10  $\mu\text{L}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  (50  $\mu\text{M}$ ), 20  $\mu\text{L}$  das diferentes concentrações de AL e 10  $\mu\text{L}$  de BPS (0,2 mM). O  $\text{Fe}^{2+}$  e AL foram mantidos em contato por 15 min no meio de reação antes da adição de BPS. Após adição dos reagentes, os tubos contendo a mistura de reação foram mantidos a temperatura ambiente por 15 min. A atividade queladora do íon  $\text{Fe}^{2+}$  foi determinada pela formação do complexo  $\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$ .

A coloração proveniente da reação foi lida em 530 nm e 700 nm (CASAGRANDE et al., 2006). Foram feitos o branco (meio de reação) e o controle positivo (meio de reação +  $\text{Fe}^{2+}$  + BPS). A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade queladora do íon  $\text{Fe}^{2+}$  pelo AL e estimada similarmente à Equação (1).

#### 4.11. Citotoxicidade

A citotoxicidade do Ácido Lipóico extraído de *Bacillus* spp foi avaliado através da viabilidade das células CHO-K1 pelo teste do MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo] conforme descrito por Mosmann, T. (1983). As células CHO-K1 foram tratadas com diferentes concentrações de ácido lipóico (Figura 4) em dois tempos de exposição, 3h e 24h.

#### 4.12. Análises Estatísticas

Para a atividade antioxidante, os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni realizados pelo software GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 4.00 3 de abril de 2003. Os resultados serão considerados significativamente diferentes para  $P < 0,05$ . As concentrações de AL que inibem o processo oxidativo em 50% ( $IC_{50}$ ) foram estimadas pelo mesmo software utilizando uma curva hiperbólica (one site binding hyperbola).

Para a citotoxicidade, os resultados dos tratamentos foram analisados por ANOVA e comparados ao controle através do teste de Dunnet.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, M.N.; RADWAN, A.A. Novel lipoate – selective membrane sensor for the flow injection determination of  $\alpha$ -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine. **Talanta** 74:1113 – 1121, 2007

ABOUL-ENEIN, H.Y.; HOENEN, H. Validated Method for Determination of  $\alpha$ -Lipoic Acid in Dietary Supplement Tablets by Reversed Phase Liquid Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** 27: 3029 – 3038, 2005

ANGELO, E.A. **Otimização da produção de toxinas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis***. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná

ARUOMA, O.I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. **Methods in enzymology** 233: 57 – 66, 1994

BAUR, A.; HARRER, T.; PEUKERT, M.; JAHN, G.; KALDEN, J.R.; FLECKENSTEIN, B. Alpha-Lipoic Acid is an Effective Inhibitor of Human Immuno deficiency Virus (HIV-1) Replication. **Klinische Wochenschrift** 69:722 – 724, 1991

BAZARAA, W.A.; HASSAN, E.E. Response surface optimization for the continuous glucose isomerization process. **Journal of industrial microbiology** 17: 100 – 103, 1996

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta** 76: 965 – 977, 2008

BIEWENGA, G.P.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. **General pharmacology** 29 (3): 315 – 331, 1997

BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoic acid – the drug of the future? **Pharmacological Reports** 57: 570 – 7, 2005

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature** 181: 1199 – 1200, 1958

BOLANM, B.J.; ULVIK, R.J. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. **The Biochemical journal** 243(1): 55 – 59, 1987

BOX, G.E.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surface**. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. 1987

BOX, G.E.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. 1978

BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some new three-level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics** 2:455 – 75, 1960

BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; NETO, B.B. Statistical Design – **Chemometrics**, Elsevier, Amsterdam, 2006

BUSBY, R.W.; SCHELVIS, J.P.M.; YU, D.S.; BABCOCK, G.T.; MARLETTA, M.A. Lipoic acid biosynthesis: LipA is an iron – sulfur protein. **Journal of the American Chemical Society** 121: 4706 – 4707, 1999

CAO, Y.; MENG, D.J.; LU, J.; LONG, J. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology** 7: 631 – 638, 2008

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI Jr, W.A.; JABOR, J.R.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical Formulations by its Antilipoperoxidative Activity. **Journal of pharmaceutical science and technology** 7(1), 2006

CHEM, H.C. Response surface methodology for optimizing citric acid fermentation by *Aspergillus foetidus*. **Process biochemistry**, 29: 399 – 405. 1994

COLEMAN, M.D.; EASON, R.C.; BAILEY, C.J. The therapeutic use of lipoic acid in diabetes: a current perspective. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 10: 167 – 172, 2001

DEMAIN, A.; DAVIES, J.E.; ATLAS, R.M.; COHEN, G.; HERSHBERGER, C.L.; HU, W.S.; SHERMAN, D.H.; WILLSON, R.C.; WU, J.H.D. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2<sup>o</sup> ed. ASM Press Washington, D.C.. **American Society for Microbiology**, 1999

DEVASAGAYAM, T.P.A.; SUBRAMANIAN, M.; PRADHAN, D.S.; SIES, H. Prevention of singlet oxygen-induced DNA damage by lipoate. **Chemico-biological interactions** 86: 79 – 92, 1993

ERNADES, F.M.P.G. **Produção de Levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São Paulo, 2006

ESTRADA, D.E.; EWART, H.S.; TSAKIRIDIS, T.; et al. Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. **Diabetes** 45:1798 – 1804, 1996

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G.C.; DA SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L.A.; DOS REIS, P.S.; SOUZA, A.S.; DOS SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica chimica acta** 597: 179 – 186, 2007

FILINA, A.A.; DAVYDOVA, N.G.; ENDRIKHOVSKII, S.N.; et al. Lipoic acid as a means of metabolic therapy of open-angle glaucoma. **Vestnik oftalmologii** 111:6 – 8, 1995

GILMOUR, S.G. Response surface designs for experiments in bioprocessing. **Biometrics**, 62: 323 – 331, 2006

GREASHAM, R.; INAMINE, E. Nutritional improvement of process, p. 41-48. In Demain AL, Solomon (Ed), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. **American Society for Microbiology**, Washington, DC. 1986

GUIRARD, B.M.; SNELL, E.E.; WILLIAMS, R.J. The nutritional role of acetate for lactic acid bacteria. Fractionation of extracts of natural materials. **Archives of biochemistry** 9: 381, 1946

HAALAND, P.D. **Experimental design in Biotechnology**. Marcel Dekker, Inc., New York, NY. 1989

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: a simple “test tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical biochemistry** 165: 215 – 219, 1987

HERBERT, A.A.; GUEST, J.R. Lipoic acid content of *Escherichia coli* and other microorganisms. **Archives of microbiology** 106: 259, 1975

HERBERT, A.A.; GUEST, J.R. Turbidimetric and polarographic assays for lipoic acid using mutants of *Escherichia coli*. **Methods in enzymology** 18: 269 – 272, 1970

HOLMQUIST, L.; STUCHBURY, G.; BERBAUM, K.; MUSCAT, S.; YOUNG, S.; HAGER, K.; ENGEL, J.; MÜNCH, G. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. **Pharmacology & Therapeutics** xx (2006) xxx – xxx

ITANO, F.H. **Otimização da produção de quitinase de *Bacillus spp.*** Dissertação. (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina). Paraná

KAGAN, V.E.; SHVEDOVA, A.; SERBINOVA, E.; KHAN, S.; SWANSON, C.; POWELL, R.; PACKER, L. Dihydrolipoic acid: A universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. **Biochemical pharmacology** 44: 1637 – 1649, 1992

KALE, R.R. **Total synthesis of  $\alpha$ -lipoic acid and development of useful synthetic methodologies**. A thesis submitted to The University of Pune. Division of Organic Chemistry: Technology National Chemical Laboratory Pune – 411 008, India, 2004

KATAOKA, H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. **Journal of Chromatography B** 717: 247 – 262, 1998

KATAOKA, H.; HIRABAYASHI, N.; MAKITA, M. Analysis of lipoic acid in biological samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of chromatography** 615: 197 – 202, 1993

KATAOKA, H.; HIRABAYASHI, N.; MAKITA, M. Analysis of lipoic acid by gas chromatography with flame photometric detection. **Methods in Enzymology** 279: 166 – 176, 1997

KOCHI, H.; KIKUCHI, G. Mechanism of reversible glycine cleavage reaction in *Arthrobacter globiformis*. Function of lipoic acid in the cleavage and synthesis of glycine. **Archives of biochemistry and biophysics** 173(1):71 – 81, 1976

KOIKE, M.; REED, L.J.; CARROLL, W.R.  $\alpha$ -Keto acid dehydrogenation complexes. I. Purification and properties of pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenation complexes of *Escherichia coli*. **The Journal of biological chemistry** 235:1924 – 1930, 1960

LEE, S.; CHEN, W. Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology. **Enzyme and microbial technology** 21, 436 – 440, 1997

LI, Y.; ZHAO, Y.; YU, W.; JIANG, S. Scavenging ability on ROS of alpha-lipoic acid (ALA). **Food Chemistry** 84: 563 – 567, 2004

LODGE, L.; HANDELMAN, G.J.; KONISHI, T.; MATSUGO, S.; MATHUR, V.V.; PACKER, L. Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. **The Journal of applied nutrition** 49: 3 – 11, 1997

MACLEAN, A.I.; BACHAS, L.G. Homogeneous enzyme immunoassay for lipoic acid based on the pyruvate dehydrogenase complex: A model for an assay using a conjugate with one ligand per subunit. **Analytical biochemistry** 195: 303 – 307, 1991

MADDOX, I.S.; REICHERT, S.H. Use of response surface methodology for rapid optimization of microbiological media. **The Journal of applied bacteriology** 43: 197 – 204. 1977

MAITRA, I.; SERBINOVA, E.; TRITSCHLER, H.J.; PACKER, L. Alpha-lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. **Free radical biology & medicine** 18:823 – 829, 1995

MC FADDIN, J.F. **Mc Farland's nephelometer standards**. 2<sup>nd</sup> edn, p 482. Williams & Wilkins, 1980

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods** 65: 55 – 63, 1983

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments**. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. 1995

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; SGHERRI, C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. **Plant physiology and biochemistry** 40: 463 – 470, 2002

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo, 2002

O'KANE, D.E.; GUNSALUS, I.C. Aspartic-alanine Transaminase, an Artifact. **The Journal of biological chemistry** 170: 433 – 439, 1947

OU, P.; NOUROOZ-ZADEH, J.; TRITSCHLER, H.J.; WOLFF, S.P. Activation of aldose reductase in rat lens and metal-ion chelation by aldose reductase inhibitors and lipoic acid. **Free radical research** 25:337 – 346, 1996

OU, P.; TRITSCHLER, H.J.; WOLFF, S.P. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant ? **Biochemical pharmacology** 50(1): 123 – 126, 1995

PACKER, L.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. **Free radical biology & medicine** 20: 625 – 626, 1996

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free radical biology & medicine** 19: (2) 227 – 250, 1995

PANIGRAHI, M.; SADGUNA, Y.; SHIVAKUMAR, B.R. Apha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. **Brain research** 717:184 – 188, 1996

PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* - kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. **Enzyme and microbial technology** 24: 191 – 199, 1999

PRATT, K.J.; CARLES, C.; CARNE, T.J.; DANSON, M.J.; STEVENSON, K.J. Detection of bacterial lipoic acid. A modified gas-chromatographic-mass-spectrometric procedure. **The Biochemical journal** 258: 749 – 754, 1989

PURI, S.; BEG, Q.K.; GUPTA, R. Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. by Response Surface Methodology. **Current microbiology** 44: 286 – 290, 2002

QUINTANA, L.R. **Produção, caracterização e aplicação de quitooligossacarídeos obtidos por fermentação utilizando *Bacillus* spp.** 2009. Dissertação ((Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná

REED, L.J. From lipoic acid to multi-enzyme complexes. **Protein Science** 7: 220 – 224, 1998

REED, L.J. The chemistry and function of lipoic acid. **Advances in Enzymology** 18: 319 – 347, 1957

REED, L.J.; DEBUSK, B.G.; GUNSALUS, I.C.; HORNBERGER, C.S. Jr. Crystalline  $\alpha$ -lipoic acid: A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. **Science** 114: 93 – 94, 1951

REED, L.J.; KOIKE, M.; LEVITCH, M.E.; LEACH, F.R. Studies on the nature and reactions of protein-bound lipoic acid. **The Journal of biological chemistry** 232: 143 – 158, 1958

REIO, L. Supplementary data for the paper-chromatographic separation and identification of phenol derivatives and related compounds of biochemical interest, using a "reference system". **Journal of chromatography** 4: 458 – 476, 1960

SANTOS, H.J.; DAVID, J.; GARCERA, A.; ZUNIEGA, R.R. Effects of Varying Physical and Chemical Factors on the Growth of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and on the Eukaryotic Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. BIO120 **General Microbiology** (Laboratory) 1<sup>st</sup> Semester SY 2008 – 2009



SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian journal of microbiology** 50: 1 – 17, 2004

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and biophysical research communications** 269: 357 – 360, 2000

SCHMIDT, U.; GRAFEN, P.; ALTLAND, K.; GOEDDE, H.W. Biochemistry and chemistry of lipoic acids. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology** 32: 423 – 469, 1969

SCOTT, B.C.; ARUOMA, O.I.; EVANS, P.E.J.; VAN DER VLIET, A.; CROSS, C.E.; TRITSCHLER, H.; HALLIWELL, B. Lipoic and dihydrolipoic acid as antioxidants. A critical evaluation. **Free radical research** 20: 119 – 133, 1994

SEGALL, A.; SOSA, M.; ALAMI, A.; ENERO, C.; HORMAECHEA, F.; PIZZORNO, M.T. Stability study of lipoic acid in the presence of vitamins A and E in o/w emulsions for cosmetic application. **Journal of cosmetic science** 55(4): 449 – 461, 2004

SHARMA, P.; SINGHA, L.; DILBAGHI, N. Optimization of process variables for decolorization of Disperse Yellow 211 by *Bacillus subtilis* using Box–Behnken design. **Journal of Hazardous Materials** 164: 1024 – 1029, 2009

SNELL, E.E.; STRONG, F.M.; PETERSON, W.H. Growth factors for bacteria VI. Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. **The Biochemical journal** 31: 1789 – 99, 1937

SOARES, E.A. **Bioconversão de sorbitol a sorbose (precursor na síntese de vitamina C) por *Gluconobacter* spp isolada de fermentadores de vinagre**. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Paraná, 2002

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; GOHLA, S. A novel approach based on lipid nanoparticles (SLN\_) for topical delivery of  $\alpha$ -lipoic acid. **Journal of microencapsulation** 22(6): 581 – 592, 2005

STROBEL, R.J.; NAKATSUKA, W.M. Response surface methods for optimizing *Saccharopolyspora spinosa*, a novel macrolide producer. **Journal of industrial microbiology** 11: 121 – 127, 1993

STROBEL, R.J.; SULLIVAN, G.R. **Experimental Design for Improvement of Fermentations**. In: Demain et al. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2 ed. Washington, DC. ASM Press, 80 – 93, 1999

STRODTER, D.; LEHMANN, E.; LEHMANN, U.; et al. The influence of thioctic acid on metabolism and function of the diabetic heart. **Diabetes research and clinical practice** 29:19 – 26, 1995

SUZUKI YJ, TSUCHIYA M, PACKER L, Thioctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. **Free radical research communications** 15: 255-263, 1991

SUZUKI, Y.J.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L. Determination of structure-antioxidant activity relationships of dihydrolipoic acid. **Methods in enzymology** 234: 454 – 461, 1994

TANG, X.J.; HE, G.Q.; CHEN, Q.H.; ZHANG, X.Y.; ALI, M.A.M. Medium optimization for the production of thermal stable b-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. **Bioresource Technology** 93: 175 – 181, 2004

UENO, C.T. **Cultivo de Trichoderma atroviride para a biossíntese do 6-pentil a pirona e sua ação sobre Mycosphaerella fijienis e Phakopsora pachyrhizi**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná

VENTER, G. **Non-dimensional response surfaces for structural optimization with uncertainty**, PhD Thesis, University of Florida, USA, 1998

VIANEY-LIAUD, N.; KOBREHEL, K.; SCUVAIRE, Y.; WONG, J.H.; BUCHANAN, B.B. Lipoic Acid in Wheat Grains. **Journal of agricultural and food chemistry** 42: 1110 – 1114, 1994

VIDAURRE, T.J.C. **Estudos de otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento de nova linhagem de *Bacillus thuringiensis***. 1996. Doutorado campinas UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas-SP)

WAGH, S.S.; NATRAJ, C.V.; MENON, K.K.G. Mode of action of lipoic acid in diabetes. **Journal of biosciences** 11: 59 – 74, 1987

WANG, J.; WAN, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy** 34: 235 – 244, 2009

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta** 1694: 299 – 310, 2004

WHITE, R.H. A gas chromatographic method for the analysis of lipoic acid in biological samples. **Analytical biochemistry** 110: 89-92, 1981

WHITE, R.H. Stoichiometry and stereochemistry of deuterium incorporated into fatty acids by cells of *Escherichia coli* grown on [methyl-2H<sub>3</sub>] acetate. **Biochemistry** 19; 9 – 15, 1980

WOLZ, P.; KRIEGLSTEIN, J. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid and its enantiomers demonstrated in rodent models of focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology** 35:369 – 375, 1996

YAZGAN, A.; OZCENGIZ, G.; OZCENGIZ, E.; KILINÇ, K.; MARAHIEL, M.A.; ALAEDDINOGLU, N.G. Bacilysin biosynthesis by a partially-purified enzyme fraction from *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology** 29: 400 – 406, 2001

ZABRISKIE, D.W.; ARMIGER, W.B.; PHILLIPS, D.H.; ALBANO, P.A. **Traders' Guide to Fermentation Media Formulation**. Trades Protein, Memphis, Tenn. 1980

ZIYATDINOVA, G.K.; BUDNIKOV, G.K.; POGOREL'TSEV, V.I. Electrochemical Determination of Lipoic Acid. **Journal of Analytical Chemistry** 59 (3): 288 – 290, 2004

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Resultados e Discussão deste trabalho se encontram na forma de artigos, conforme se segue:

Artigo 1: Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de Ácido Lipóico por *Bacillus* spp

Artigo 2: Culture condition effects on Lipoic Acid biosynthesis by *Bacillus* spp

Artigo 3: Avaliação da atividade antioxidante e citotoxicidade do Ácido Lipóico obtido por *Bacillus* spp

## 6.1. Artigo 1

### Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de Ácido Lipóico por *Bacillus* spp

### Effect of different carbon and nitrogen sources in the production of lipoic acid by *Bacillus* spp

Luiz Rodrigo I. Morioka<sup>1</sup>, Raúl Jorge H. C. Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

#### Resumo

---

O Ácido Lipóico (AL) é um composto que age como cofator no metabolismo energético celular. Dada sua estrutura molecular, tem capacidade de atuar em reações de óxido-redução, no transporte de elétrons e de grupos acetil. Tal processo acontece a nível mitocondrial e compreende um conjunto de reações do ciclo de Krebs. O Ácido Lipóico é um antioxidante natural que neutraliza uma variedade de radicais livres. Neste trabalho utilizou-se um delineamento fatorial fracionado ( $2^{8-4}$ ) para o estudo dos efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de AL por *Bacillus* spp. Quando se utilizaram os níveis máximos dos compostos cujos efeitos foram positivos e os níveis mínimos dos compostos cujos efeitos foram negativos a concentração de AL na biomassa foi de 3.88 mM. Em contraste, quando se utilizaram os níveis máximos dos compostos com efeitos negativos e os níveis mínimos dos compostos com efeitos positivos, houve 76 % de diminuição na concentração de AL. Quando o meio foi formulado com os níveis máximos para todos os compostos estudados, verificou-se uma queda de 81% na concentração de AL. A fonte de carbono que teve maior influencia na formação de AL na biomassa de *Bacillus* spp foi a farinha de crisálida seguida de glicerol, glicose e melão. Por

outro lado, a fonte de nitrogênio que apresentou maior influência na formação de AL foi o extrato de levedura, seguida de peptona, sulfato de amônia e fosfato de amônia, sendo estas três últimas com efeitos negativos.

**Palavras-chave:** Ácido Lipóico, Antioxidante Biológico, *Bacillus* spp

### Abstract

---

The lipoic acid (LA) is a compound that acts as a cofactor in cellular energy metabolism. Given its molecular structure has the capacity to act in reactions of oxidation-reduction in electron transport and acetyl groups. This process happens at mitochondrial and includes a number of reactions of the Krebs cycle. Lipoic Acid is a natural antioxidant that neutralizes a variety of free radicals. In this study we used a fractional factorial design ( $2^{8-4}$ ) to study the effects of different carbon and nitrogen sources in the production of LA by *Bacillus* spp. When using the maximum levels of compounds whose effects were positive and the minimum levels of compounds whose effects were negative concentration of LA on biomass was 3.88 mM. In contrast, when using the maximum levels of the compounds with negative and minimum levels of compounds with positive effects, there was 76% decrease in the concentration of LA. When the medium was formulated with the maximum levels for all compounds studied, there was a fall of 81% in the concentration of LA. The carbon source had the greatest influence on the formation of LA in the biomass of *Bacillus* spp was the chrysalis meal followed by glycerol, glucose and molasses. Moreover, the source of nitrogen that most influenced the formation of LA was the yeast extract followed by peptone, ammonium sulfate and ammonium phosphate, the latter three with negative effects.

**Keywords:** Lipoic Acid, Biological Antioxidant, *Bacillus* spp

### Introdução

O Ácido Lipóico (AL) é uma molécula relativamente pequena ( $1.24 \times 10^{-26}$  Da)

constituída por uma cadeia de oito átomos de carbono e dois átomos de enxofre na região terminal, sendo considerado um importante cofator de crescimento em células vegetais,

animais e em microrganismos (REED, 1966; HERBERT; GUEST, 1975; KATAOKA, 1998). Nas células há muito pouco Ácido Lipóico na forma livre a menos que tenha sido suplementado. Estudos sobre a distribuição do AL indicaram que na forma funcional seu grupo carboxil está covalentemente ligado ao grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo lisil de complexos enzimáticos, onde atua como cofator (KATAOKA, 1998). Deste modo, a liberação do AL ocorre por hidrólise com ácido, base ou por enzimas proteolíticas.

Devido à sua propriedade de oxido-redução, o AL está envolvido no transporte de elétrons ou de grupos acetil, possibilitando assim sua ação como coenzima para numerosas reações envolvidas no metabolismo central. É utilizado no tratamento de várias doenças (OU; TRITSCHLER; WOLFF, 1995) tais como, doença hepática alcoólica (MARSHALL et al., 1982), intoxicação por metais (FISHER; SONENSHEIN, 1991; GREGUS et al., 1992; OU; TRITSCHLER; WOLFF, 1995), e doenças neurodegenerativas (ALTENKIRCH et al., 1990).

A importância médica do AL tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de métodos para sua determinação. Vários

métodos analíticos têm sido estudados para a determinação quantitativa do ácido lipóico (KATAOKA, 1998). Um método validado para a quantificação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do AL em fármacos foi usado para determinar a concentração de AL obtida da biomassa microbiana (ABOUL-ENEIN; HOENEN, 2005).

No desenvolvimento de processos de fermentação, os componentes do meio e as condições de cultivo são de grande importância no metabolismo bacteriano, pois tais fatores podem interferir na síntese e liberação do AL pelo *Bacillus* spp. O presente estudo visou determinar os efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura na produção de Ácido Lipóico por *Bacillus* spp. Para isso foi utilizado delineamento estatístico fatorial fracionado a fim de se estabelecer qualitativamente a composição do substrato para posterior caracterização do processo fermentativo.



## Metodologia

### Microrgansimo

*Bacillus* spp foi obtido do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, e mantida a 5°C em meio Agar Brain Hearth Infusion (ABHI) inclinado.

### Preparo do inóculo

A bactéria foi cultivada em caldo Brain Hearth Infusion (BHI) sob agitação (120 rpm) a 32°C durante 24 horas. Após este período, 1.0 mL desta cultura foram inoculados em 50 mL do caldo BHI estéril e incubado por mais 24 horas na mesma condição de cultivo. Então, esta cultura foi diluída em solução salina (0.85%) para obter uma concentração de  $3.0 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup> de acordo com o padrão McFarland nº1 (MC FADDIN, 1980). Uma alíquota de 0.1 mL da suspensão celular (inóculo inicial) foi inoculado assepticamente em 25 mL de meio estéril contido nos frascos experimentais (Erlenmeyers de 250 mL de

capacidade) e incubado sob agitação de 120 rpm a 32°C por 24 horas.

### Delineamento experimental

O delineamento fatorial fracionado em dois níveis  $2^{8-4}$  foi utilizado para avaliar a composição do substrato que tenha influência sobre a concentração de Ácido Lipóico na biomassa de *Bacillus* spp. Este delineamento experimental é baseado no modelo polinomial de primeira ordem. Este modelo não descreve a interação entre os fatores analisados. É utilizado para varredura e análise dos fatores que podem afetar a resposta. Foram escolhidas oito variáveis neste trabalho: (A) farinha de crisálida, (B) melaço, (C) glicose, (D) glicerol, (E) peptona, (F) extrato de levedura, (G) fosfato de amônio e (H) sulfato de amônio. As condições de cultivo foram conforme item anterior. O delineamento experimental para varredura das variáveis é mostrado na Tabela 1. Por convenção, o delineamento estatístico é expresso nos valores codificados, sendo as variáveis designadas como -1 (nível mínimo) e +1 (nível máximo). O delineamento experimental e a análise estatística dos dados

foram conduzidos com o programa computacional Statistic 6.0 Statsoft 2001.

#### Determinação da biomassa

A determinação da concentração de biomassa (peso seco) no estudo da cinética foi através do método gravimétrico. Para isso, uma alíquota de 4.0 mL da cultura foi centrifugada a 4500 x g a 10°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 4.0 mL de solução salina (0.85%) e centrifugado novamente. O precipitado da segunda centrifugação foi ressuspenso em 4.0 mL da solução salina (0.85%). Alíquotas de 1.0 mL foram transferidas para cadinhos previamente tarados, os quais foram armazenados em estufa à 105 °C até peso constante.

#### Extração do Ácido Lipóico

Após as 24 horas de cultivo, sob as condições descritas anteriormente, a cultura foi centrifugada a 12000 xg por 10 minutos e em seguida a biomassa foi lavada com solução salina (0.85%). Para a extração do AL bacteriano, 0.10 g de biomassa foi colocada em

tubo de centrífuga de polipropileno (15 mL) na qual foram adicionados 1.60 mL de soro albumina bovina (50 mg mL<sup>-1</sup>) em KOH 2.50 M e 0.40 mL de água destilada. As amostras foram hidrolisadas por 3 horas a 100 °C sob vácuo. O hidrolisado, resfriado em banho-maria, foi adicionado de 0.10 mL de 2-mercaptoetanol (solução a 1.0 mg mL<sup>-1</sup>) e 0.80 mL de HCl 6 M. O Ácido Lipóico contido nessa solução foi extraído com 4,0 mL de diclorometano e o extrato obtido foi evaporado com gás N<sub>2</sub> (KATAOKA, 1998).

#### Análise cromatográfica

Para a análise cromatográfica por CLAE o extrato obtido foi dissolvido em 1.0 mL de NaOH 0.010 M e injetado no aparelho cromatográfico. A determinação de AL foi realizada utilizando a técnica preconizada por Aboul-Enein & Hoenen (2005) com as seguintes modificações: foram utilizados, bomba LC-10AD (Shimadzu); detector UV-VIS SPD-10A (Shimadzu) ajustado para 332 nm; degaseificador DGU-2A (Shimadzu); injetor de amostra manual (Shimadzu); coluna de fase reversa Ace 5 C18 column (25 cm X 4.6 mm id). A fase móvel consistiu-se de

acetoneitrila : água (65:35 v/v). O fluxo usado foi de 1.0 mL/minuto. Para avaliação dos dados obtidos, foi utilizado o programa computacional Class-CR10 (Shimadzu).

Para a curva de calibração, uma solução estoque do padrão de Ácido Lipóico  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo 2.06 g de AL (Sigma) em 5.0 mL de  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  de solução de NaOH e completado com tampão Tris-HCl (pH = 8.5) para um volume de 100 mL. A partir desta solução estoque foram preparadas diluições para obtenção das concentrações de  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  and  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  foram preparados por diluições da

solução estoque padrão (ABBAS; RADWAN, 2007).

Estudo da cinética de crescimento associada à síntese de Ácido Lipóico

Foi realizada uma curva de crescimento para o *Bacillus* spp a fim de verificar a relação entre a concentração de Ácido Lipóico e biomassa. A cultura de células foi inoculada no meio de cultura com as fontes otimizadas conforme o item preparo do inóculo. Em intervalos de duas horas, foram retiradas alíquotas da cultura para análise de biomassa (gravimetria) e determinação da concentração de Ácido Lipóico.

## Resultados e Discussão

Análise estatística dos componentes do meio de fermentação

Foram avaliados oito componentes do meio de fermentação na síntese de Ácido Lipóico utilizando delineamento Box, Hunter & Hunter  $2^{8-4}$ . A concentração de AL na biomassa variou de 0.41 mM a 3.88 mM, sugerindo que a composição do substrato no meio de cultura influenciou na síntese deste composto pelo *Bacillus* spp. A análise estatística dos oito fatores (Tabela 2) mostrou que A, C, D e F apresentaram efeitos positivos sobre a concentração de Ácido Lipóico, enquanto que B, E, G e H demonstraram efeitos negativos na síntese de Ácido Lipóico na biomassa da bactéria. A formulação do meio de cultura com os compostos de efeitos positivos em seus níveis máximos e com os níveis mínimos dos compostos com efeitos

negativos afetou a concentração do Ácido Lipóico liberado na biomassa da bactéria obtendo-se um valor de 3.88 mM. Por outro lado, nos experimentos com o meio de cultura formulado com níveis mínimos dos compostos com efeitos positivos e níveis máximos dos compostos com efeitos negativos, a biomassa da bactéria apresentou uma concentração de 0.93 mM de Ácido Lipóico. Quando o meio foi formulado com os níveis máximos para todos os compostos estudados, verificou-se uma concentração de 0.71 mM de Ácido Lipóico. Considerando a concentração de 3.88 mM como sendo o valor máximo de Ácido Lipóico obtido, verificou-se que quando as variáveis com efeito negativo estão presentes na formulação do meio em níveis mínimos, a queda na concentração de Ácido Lipóico foi de 57 %, mas quando foram utilizados os níveis máximos das variáveis com efeito negativo, verificou-se uma queda de 81 % (Tabela 1).

**Tabela 1.** Estudo dos efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a concentração de AL em *Bacillus* spp através do delineamento fatorial fracionado 2<sup>8-4</sup>

Corrida	Variáveis Codificadas								Ácido Lipóico (mM)
	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.65
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	0.56
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	0.93
4	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1.41
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	0.77
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	0.80
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	1.53
8	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.84
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0.41
10	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1.13
11	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	0.83
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.87
13	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0.57
14	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	3.88
15	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1.05
16	1	1	1	1	1	1	1	1	0.71

O *Bacillus* spp possui a capacidade de utilizar numerosos carboidratos como fonte de carbono e energia. A fonte de carbono que teve maior influencia na síntese de Ácido Lipóico foi farinha de crisálida seguido de glicerol, glicose e melão, apresentando esta última um efeito levemente negativo (-0.07696). Por outro lado, a fonte de nitrogênio que mais

influenciou na formação de Ácido Lipóico foi o extrato de levedura seguido de peptona, sulfato de amônia e fosfato de amônia, sendo estas três últimas com efeitos negativos (Tabela 2).

Os efeitos das diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a concentração de Ácido Lipóico na biomassa de *Bacillus* spp

estão mostrados na Tabela 2. Como se pode observar nesta tabela, a farinha de crisálida apresentou o maior efeito positivo não significativo (+0.43220) dentre as fontes de carbono estudadas. Isto significa que a concentração de Ácido Lipóico aumenta conforme o nível de farinha de crisálida é aumentado de 0.0134 g/mL para 0.134 g/mL no meio de cultura. Por outro lado, a glicose e o glicerol também tiveram efeitos positivos, porém menores do que a farinha de crisálida. Da mesma forma, o efeito da glicose e do glicerol na concentração de Ácido Lipóico na biomassa da bactéria em estudo, aumenta de forma não significativa ( $p > 0.05$ ) com o aumento dos níveis de 0.0121 g/mL para 0.121 g/mL e 0.0124 g/mL para 0.124 g/mL, respectivamente. O melão teve um efeito levemente negativo (-0.07696) em relação às

demais fontes de carbono utilizadas, significando que a concentração de Ácido Lipóico diminui de forma não significativa ( $p > 0.05$ ) com o aumento do nível deste nutriente. Dentre as fontes de nitrogênio utilizadas, apenas o extrato de levedura apresentou um efeito positivo (+0.15783) não significativo ( $p > 0.05$ ), indicando que a concentração de Ácido Lipóico aumenta conforme o nível de extrato de levedura é aumentado de 0.025 g/mL para 0.25 g/mL. A peptona, fosfato e o sulfato de amônio apresentaram efeitos negativos não significativos ( $p < 0.19320$ ;  $p < 0.08630$ ; e  $p < 0.22444$ , respectivamente), indicando que a concentração de Ácido Lipóico na biomassa da bactéria diminui conforme o nível dessas variáveis aumentou dentro dos níveis estudados.

**Tabela 2.** Análise estatística da composição do meio utilizando o delineamento Box, Hunter & Hunter 2<sup>8-4</sup> com as concentrações dos componentes do meio em diferentes níveis para a síntese de AL em *Bacillus* spp

Variáveis	Nível máximo (g/mL)	Nível mínimo (g/mL)	Efeito principal	Coefficiente	p
Farinha de crisálida	0.134	0.0134	0.432	0.216	0.3069
Melaço	0.998	0.0998	-0.077	-0.038	0.8500
Glicose	0.121	0.0121	0.169	0.085	0.6790
Glicerol	0.124	0.0124	0.247	0.123	0.5492
Peptona	0.192	0.0192	-0.565	-0.282	0.1932
Extrato de levedura	0.250	0.0250	0.158	0.079	0.6994
Fosfato de amônio	0.114	0.0114	-0.782	-0.391	0.0863
Sulfato de amônio	0.114	0.0114	-0.523	-0.261	0.2244

P < 0.05

No isolamento de substâncias da biomassa de microrganismos é muito importante verificar se a concentração destas é afetada ou não pela composição do meio de cultura. Haulý; Oliveira; Balduíno (1999) e Payot; Chemal; Fick (1999) encontraram diferenças na produção de metabólitos microbianos variando a composição do meio de cultura utilizado na fermentação. Da mesma forma, diferentes condições nutricionais para o desenvolvimento microbiano podem afetar a constituição química do microrganismo. Fisher; Sonenshein (1991) postularam que o amônio, quando em quantidade excessiva no

meio de cultura, impossibilita a metabolização de outras fontes de nitrogênio em função da inibição da glutamina sintetase. Nesse trabalho, quando o fosfato e o sulfato de amônio encontravam-se no nível máximo a concentração de AL na biomassa da bactéria foi menor do que quando no nível mínimo (Tabela 2). Isto sugere que esses compostos podem estar inibindo algumas vias metabólicas que participam da síntese de AL que por sua vez pode afetar o metabolismo celular envolvido na formação de grupos acetil.

Assim, para a composição do meio de cultura para a maior produção de AL na

biomassa de *Bacillus* spp poderia ser formulado com farinha de crisálida como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, já que o melão, o fosfato de amônio, a peptona e o sulfato de amônio exercem uma repressão na formação desta substância (Tabela 2). Cabe mencionar que no caso das fontes de carbono, o glicerol e a glicose também poderiam ser utilizados na formulação do meio já que apresentaram efeitos positivos, porém menores do que a farinha de crisálida.

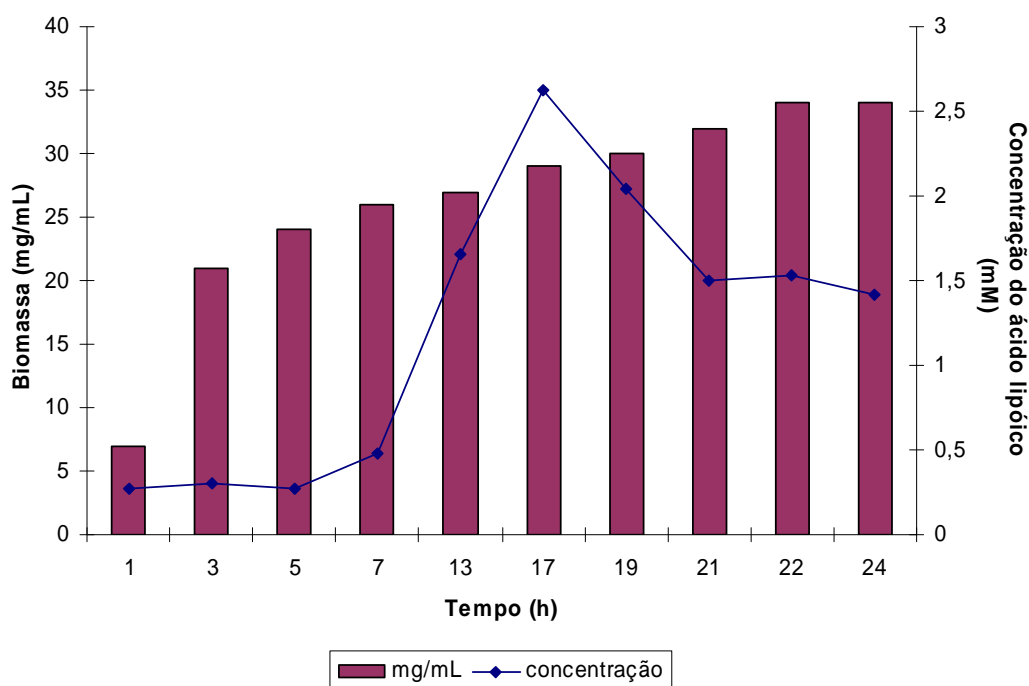
#### Cinética da síntese de Ácido Lipóico

O estudo da cinética de crescimento de *Bacillus* spp visou verificar se há relação entre a concentração de Ácido Lipóico com a biomassa produzida durante o período de fermentação. O monitoramento durante todo o processo fermentativo foi realizado com a

retirada de amostras num intervalo de 24 horas de fermentação. Em seguida procedeu-se a determinação dos parâmetros cinéticos de interesse: biomassa seca (gravimetria) e concentração de Ácido Lipóico.

A concentração de Ácido Lipóico e da biomassa está mostrado na Figura 1 para a biossíntese de AL utilizando o delineamento Box, Hunter, & Hunter. As concentrações dos componentes do meio de cultura cujos efeitos principais foram positivos foram mantidas em seus níveis máximos testados e os componentes com efeito principal negativo foram mantidos em seus níveis mínimos. Assim, o meio de cultura otimizado continha: farinha de crisálida, 0.134 g/mL; melão, 0.998 g/mL (1° BRIX); glicose, 0.121 g/mL; glicerol, 0.124 g/mL; peptona, 0.0192 g/mL; extrato de levedura, 0.250 g/mL; fosfato de amônio, 0.011 g/mL e sulfato de amônio, 0.011 g/mL.





**Figura 1.** Produção fermentativa de biomassa e Ácido Lipóico por *Bacillus* spp

A Figura 1 apresenta o crescimento microbiano mensurado em determinados intervalos de tempo durante 24 horas de cultivo. Quanto à cinética microbiana para o *Bacillus* spp, (Figura 1) observou-se que a fase de adaptação se deu no período de 0 a 3 horas, a fase de crescimento exponencial ou logarítmica no período de 5 a 21 horas de fermentação. A fase estacionária se deu após o período de 22 horas em que se observou um patamar na concentração celular. Nessa fase células ativas são induzidas à diferenciação em células esporuladas devido à diminuição

acentuada na concentração dos nutrientes decorrente da utilização do mesmo pelo microrganismo para seu crescimento. Além disso, durante a fermentação, o microrganismo pode produzir metabólitos que, com o acúmulo, inibem seu próprio crescimento. A máxima concentração de AL (2,7 mM) foi obtida em 17 h de fermentação na fase de crescimento exponencial que consiste em condições nutricionais e ambientais adequadas, às quais o microrganismo está adaptado e seu metabolismo está elevado. No período de 17 a 22 horas, embora ainda na fase de crescimento

exponencial, a concentração de AL diminuiu, para 1.4 mM. Este resultado mostra que a concentração de Ácido Lipóico não é influenciada pelo aumento da biomassa microbiana e sim pela sua condição metabólica durante seu crescimento.

Neste trabalho determinaram-se os efeitos e selecionaram-se as melhores fontes de carbono e nitrogênio na produção de AL por *Bacillus* spp. A máxima concentração de Ácido Lipóico de 3.88 mM foi obtida utilizando o meio otimizado determinado por delineamento estatístico. As variáveis que afetaram de forma positiva na produção do AL foram glicerol e extrato de levedura. Essas variáveis identificadas pelo planejamento estatístico foram consideradas para o estudo posterior das condições de cultivo na produção de Ácido Lipóico por *Bacillus* spp.

#### Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina – PR e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido.

#### Referências

- ABBAS, M. N.; RADWAN, A. A. Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of  $\alpha$ -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine. *Talanta*, v.74, p.1113– 121, 2007
- ABOUL-ENEIN, H. Y.; HOENEN, H. Validated Method for Determination of  $\alpha$ -Lipoic Acid in Dietary Supplement Tablets by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.27, p.3029–3038, 2005
- ALTENKIRCH, H.; STOLTENBURG-DIDINGER, G.; WAGNER, H. M.; HERMANN, J.; WALTER, G. Effects of lipoic acid in hexacarbon-induced neuropathy. *Neurotoxicology and teratology*, v.12, p.619–622, 1990
- FISHER, S. H.; SONENSHEIN, A. L. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annual review of microbiology*, v.45, p.107–35, 1991

- GREGUS, Z.; STEIN, A. F.; VARGA, F.; KLAASSEN, C. D. Effect of lipoic acid on biliary excretion of glutathione and metals. *Toxicology and applied pharmacology*, v.114, p.88–96, 1992
- HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. S.; BALDUÍNO, R. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.19, p.363–366, 1999
- HERBERT, A. A. GUEST, J. R. Lipoic acid content of *Escherichia coli* and other microorganisms. *Archives of microbiology*, v. 106, p. 259, 1975
- KATAOKA, H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B*, v.717, p.247–262, 1998
- MARSHALL, A. W.; GRAUL, R. S.; MORGAN, M. Y.; SHERLOCK, S. Treatment of alcohol-related liver disease with thioctic acid: a six month randomized double-blind trial. *Gut*, v.23, p.1088–1093, 1982
- MC FADDIN, J. F. Mc Farland's nephelometer standards. 2<sup>nd</sup> ed, p.482. Willians & Wilkins, 1980
- OU, P.; TRITSCHLER, H. J.; WOLFF, S. P. Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant ? *Biochemical pharmacology*, v.50, n.1, p.123–126, 1995
- PAYOT, T.; CHEMAL, Y. Z.; FICK, M. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* - kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and microbial technology*, v.24, p.191–199, 1999
- REED, L. J. in Florkin M, Stotz EH. *Comprehensive Biochemistry*, v.14, Elsevier Publishing Company, New York, p. 99, 1966

## 6.2. Artigo 2

### Culture Condition Effects on Lipoic Acid Biosynthesis by *Bacillus* spp

Luiz Rodrigo I. Morioka <sup>1</sup>, Raúl J. H. Castro Gómez <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

**Abstract.** Response surface methodology (RSM) was used to evaluate the culture conditions effect on Lipoic Acid (LA) biosynthesis by *Bacillus* spp. Based on preliminary studies a fractional factorial design with three-level was applied to elucidate the effects of glycerol, yeast extract, agitation (rpm) and temperature on Lipoic Acid biosynthesis. Box–Behnken design analysis was adopted for further investigation of interaction between these variables to determine the maximum concentration of Lipoic Acid in *Bacillus* spp biomass. By response surface methodology the optimal culture conditions for Lipoic Acid biosynthesis were obtained with 25 mg/mL of glycerol, 15 mg/mL of yeast extract at 30 °C and 150 rpm. Verification of the optimization showed that Lipoic Acid biosynthesis of 1.35 g/L, biomass of 25 g/L with a yield of 5.40 % was observed under these optimal conditions.

*Bacillus* spp is a Gram-positive bacterium that synthesizes numerous metabolites enabling the bacterium to survive in a continuously changing environment. *Bacillus* spp synthesize Lipoic Acid depending on their metabolic condition. LA is a natural occurring cofactor reported in a diverse group of microorganisms [4], which plays an essential role in mitochondrial dehydrogenase reactions and has gained considerable attention as an antioxidant. LA acts both in membranes and in aqueous phases [6]. Due to its unique properties, it has also been administered in the treatment of various oxidative stress related diseases such as alcoholic liver disease, heavy metal poisoning, mushroom poisoning, diabetes, glaucoma, ischemia/reperfusion

injury of heart and heart mitochondria, chagas disease and neurodegenerative disorder [7].

Microorganisms are typically well adapted to their environment. Variations of environmental or biochemical factors directly related to the microorganisms can cause different effects on microbial metabolism. Because of this importance, it is just right to investigate some of these physical and chemical influences. The classical method of 'one-variable-at-a-time' bioprocess design may be effective in some situations, but fails to consider the combined effects of all involved factors [9]. Factorial design optimization and response surface methodology (RSM) fulfill this requirement. RSM is a collection of

mathematical and statistical techniques widely used to determine the effects of several variables and to optimize different biotechnological process [8].

The collective role of fermentation parameters in the Lipoic Acid biosynthesis by *Bacillus* spp has not been reported. In a preliminary study was found that the source of carbon and nitrogen that had major influence on the biosynthesis of LA in the biomass of *Bacillus* spp were glycerol and yeast extract. Therefore, the objective of the present work was to optimize culture conditions for higher Lipoic Acid concentration in the biomass of *Bacillus* spp, applying response surface methodology, considering the interaction between glycerol, yeast extract, agitation (rpm) and temperature (°C).

## Materials and Methods

**Microorganism and maintainance.** The *Bacillus* spp. obtained from the Food Science and Technology Department, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil, was used in the present study. The microorganism was grown and maintained on Brian Hearth Infusion (BHI) Agar after cultivating for 24h at 30 °C. Cultures were preserved at 5 °C for short term storage and were sub cultured every 8 weeks.

**Inoculum and cultivation condition.** The inoculum was prepared using a slant culture that was scraped off and the biomass inoculated in 250 mL Erlenmeyers flask with 25 mL of sterile BHI broth and incubated for 24 h at 30 °C and 150 rpm. From this culture an aliquot was diluted in 10 mL of sterile saline

solution (0.85 %) to obtain a Farland Standard n° 1 ( $3.0 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>). From this solution, 0.1 mL was added to each 250 mL Erlenmeyers flasks with 25 mL of culture medium and incubated for 24 h in accordance with the specific experimental design (see Table 1, 2 and 3). Then the culture of each flask was centrifuged at 10000 xg for 10 min to obtain the wet biomass for lipoic acid extraction.

**Extraction of Lipoic Acid.** For the extraction of LA from the biomass of the bacterial culture, 0.10 g of wet biomass was placed in a polypropylene centrifuge tube and 1.60 mL of Bovine Serum Albumin (BSA) 50 mg mL<sup>-1</sup> in KOH 2.50 M and 0.40 mL of distilled water were added. Then the samples were hydrolyzed for 3 hours at 110 °C under vacuum. The resulting hydrolysate was cooled in a ice-bath and then, 0.10 mL of 2-mercaptoethanol (1.0 mg mL<sup>-1</sup> solution) and 0.80 mL of HCl 6 M were added. This solution was extracted with 4.0 mL of methylene chloride, and the extract obtained was evaporated to dryness with N<sub>2</sub> gas. Then the residue was dissolved in 1.0 mL of NaOH 0.01 M and stored under refrigeration until analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [5].

**Chromatographic Analysis.** HPLC pump LC-10AD (Shimadzu); UV-VIS detector SPD-10A (Shimadzu) was set at 332 nm; degasser DGU-2A (Shimadzu); manual injection (Shimadzu); reversed phase Ace 5 C18 column (25 cm X 4.6 mm id); the software Class-CR10 (Shimadzu) on a personal computer was used for device control and data evaluation. The mobile phase consisted of

acetonitrile:water (65:35 v/v) and was pumped at a flow rate of 1.0 mL mL<sup>-1</sup>. A validated method for the determination of lipoic acid in biological samples was adapted and used for the quantification of this component present in *Bacillus* spp biomass [2].

A standard stock solution of 0.10 mol Lipoic Acid L<sup>-1</sup> was prepared by dissolving 2.06g of Lipoic Acid (Sigma) in 5.0 mL of 0.10 mol L<sup>-1</sup> NaOH solution and made to volume into 100 mL measuring flask with HCl-Tris buffer of pH 8.5. The working standards of 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> and 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> concentration were prepared by proper dilution of the stock solution [1].

**Response Surface Methodology (RSM).** The effects of culture conditions on Lipoic Acid biosynthesis in the biomass of *Bacillus* spp, were initially studied by using two fractional factorial design with three levels factors 3<sup>(3-1)</sup>. The parameters defined levels used on the first and second experiments are showed on Table 1 and 2, respectively.

To define the optimal concentration of glycerol and yeast extract that allowed *Bacillus* spp to synthesize maximum amount of lipoic acid in the biomass, a three factor Box-Behnken [3] experiment designs was applied (see Table 3).

All the experiments were analysed by the software, Estatistica 6.0. using the lipoic acid concentration after 24 h. culture, as response.

## Results and Discussion

Previous experiments using several carbon and nitrogen sources showed that glycerol and yeast extract affect positively the Lipoic Acid concentrations in the biomass of *Bacillus* spp. Therefore, concentration of the optimization of these nutrients for fermentation medium formulation and culture conditions was performed.

Table 1 shows the response (Lipoic Acid concentration, mM) together with the maximum and minimum variables levels chosen for trials in previous experiments. Temperature was fixed at 32 °C while the agitation rate varied from 60 rpm to 180 rpm. It can be seen that there was a considerable variation in Lipoic Acid concentration from 0.63 mM (run n° 7) to 1.64 mM (run n° 9), which indicate that cultivation conditions affect the biosynthesis of Lipoic Acid in the bacteria biomass. According to the results, the determination coefficient (R<sup>2</sup>) of 0.5119 means that 51.19 % of the response variation is explained by the model, this value it's acceptable to biological systems. On the other hand, the non-significant value of the lack of fit (p=0.691109) allowed to state predictive analysis for the response under the experimental culture condition obtained from the model. The contour plot (Figure 1) shows that, as the yeast extract concentration increased from 2 mg/mL up to 10 mg/mL, an increase of Lipoic Acid concentration was observed. An increase of glycerol concentration from 4 mg/mL up to 20 mg/mL, showed a sharp incline in Lipoic Acid concentration. It can be seen (Table 1) that Lipoic Acid concentration in the biomass of *Bacillus* spp was also affected by the rate of

agitation, been favored under aerated condition. The concentration ranges of glycerol and yeast extract and agitations rates as well did not allowed defining a culture conditions for

maximum Lipoic Acid production since none of these factors had any significant effects in the response.

Table 1. Experimental conditions and results obtained from fractional factorial design with three levels, keeping the temperature constant at 32 °C

Trial number	Variables decoded			Lipoic acid (mM)*
	Glycerol (mg/mL)	Yeast extract (mg/mL)	Agitation (rpm)	
1	4	2	60	0.82
2	4	6	180	0.72
3	4	10	120	1.00
4	12	2	180	1.01
5	12	6	120	1.29
6	12	10	60	1.00
7	20	2	120	0.63
8	20	6	60	0.94
9	20	10	180	1.64
10	12	6	120	0.65
P*	0.838	0.662	0.820	

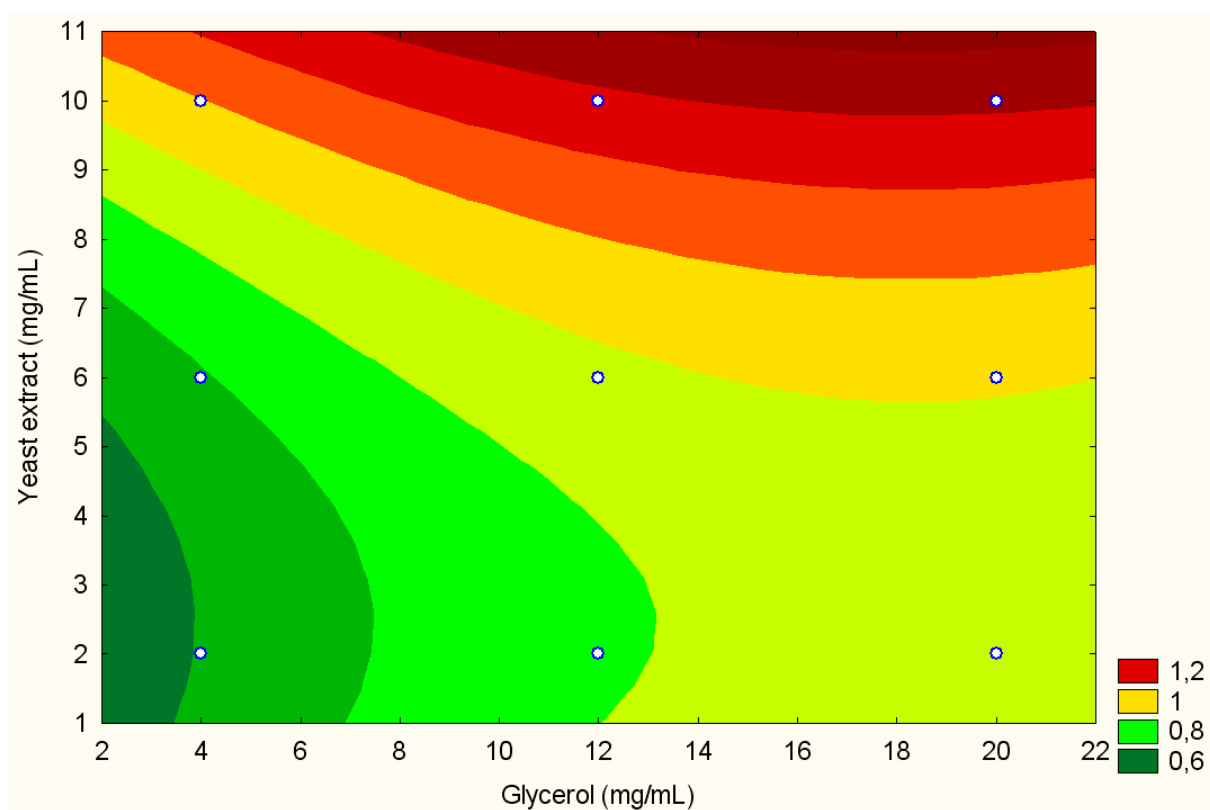


Figure 1. Response surface contour plot of Lipoic Acid biosynthesis affected by glycerol and yeast extract using fractional factorial design with three-level, keeping the temperature constant at 32 °C

Table 2 shows the maximum and minimum concentration levels of glycerol and yeast extract. In this experiment, temperature varied from 25 – 35 °C, keeping the agitation rate constant at 150 rpm. It can be seen from Table 2, that there was a considerable variation in Lipoic Acid concentration in the biomass of *Bacillus* spp depending on the variables concentration levels. The maximum Lipoic Acid concentration (1.77 mM) was achieved in run number 6, while the minimum lipoic acid concentration (0.42 mM) was observed in run number 2. The determination coefficient ( $R^2$ ) of 0.8730 means that 87.30 %

of the response variation is explained by the model. The significant value of lack of fit ( $p=0.033608$ ) was mainly due to the low value of the pure error (0.000200). Taking this in consideration, it can not be considered and therefore validating the mathematical model for predictive purposes within the experimental region. The contour plot from Figure 2 it shows that, as the yeast extract concentration increased from 10 mg/mL up to 14 mg/mL, an increase in Lipoic Acid concentration was observed. Glycerol showed a smooth increase effect in Lipoic Acid concentration as it was increased from 11 mg/mL to 27 mg/mL.

Table 2. Experimental conditions and results obtained from fractional factorial design with three levels, maintaining constant agitation at 150 rpm

Trial number	Variables Decoded			Lipoic acid (mM)*
	Glycerol (mg/mL)	Yeast extract (mg/mL)	Temperautre (°C)	
1	11	6	25	1.08
2	11	10	35	0.42
3	11	14	30	0.65
4	19	6	35	0.92
5	19	10	30	0.91
6	19	14	25	1.77
7	27	6	30	0.56
8	27	10	25	0.81
9	27	14	35	1.35
10	19	10	30	0.93
P*	0.020	0.021	0.023	



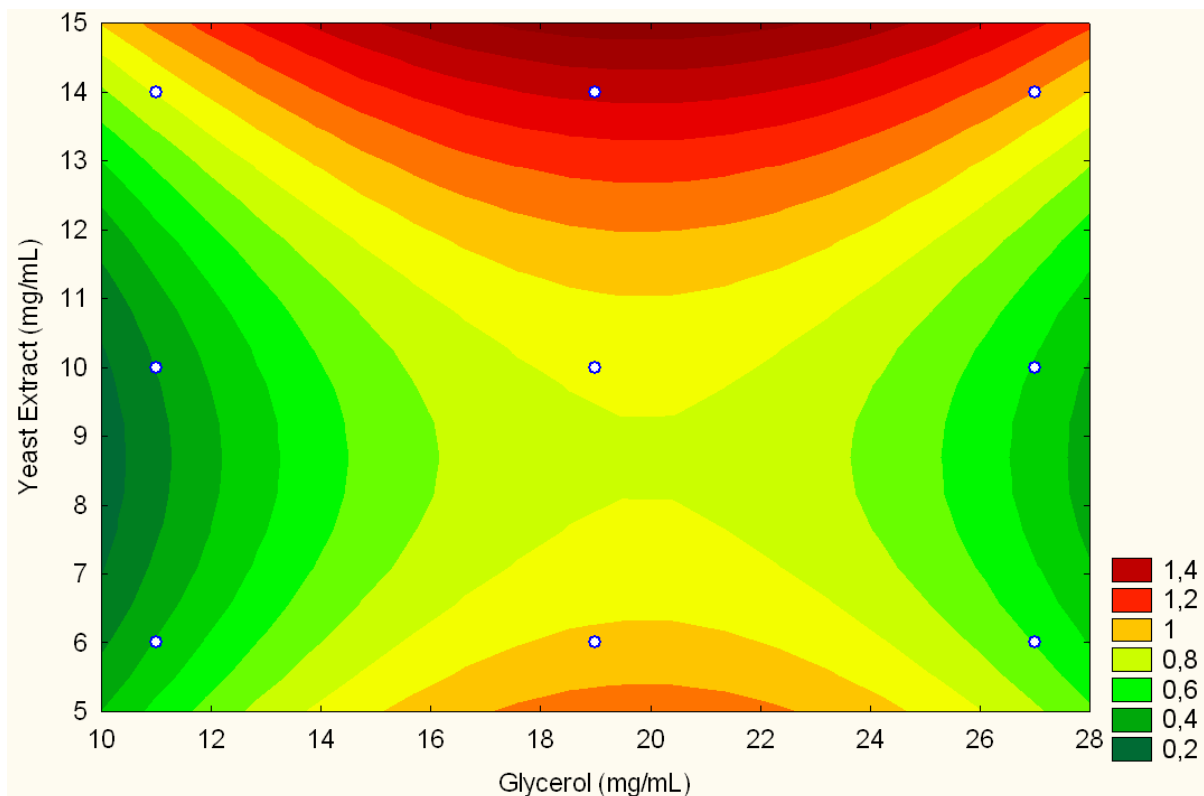


Figure 2. Response surface contour plot of Lipoic Acid biosynthesis affected by glycerol and yeast extract using fractional factorial design with three-level, maintaining constant agitation at 150 rpm

The above experimental results were not conclusive for defining best culture condition for maximum biomass Lipoic Acid concentration in *Bacillus* spp, but they shows clearly that concentration of this constituent is highly dependent on the *Bacillus* spp. culture conditions, eg. medium composition, temperature and agitation.

In Table 3, the maximum and minimum variables concentration levels are shown for trials in Box-Behnken design., which was used to define optimal cultivation conditions of *Bacillus* spp with high biomass Lipoic Acid concentration. It can be seen from Table 3, that again, just like the first experiment, there was a considerable variation in the biomass Lipoic Acid concentration depending on glycerol and yeast extract concentration and temperature, as well. The maximum Lipoic

Acid concentration was 1.35 g/L, corresponding to a yield of 5.40 %.(p/p) of the biomass produced under the best production conditions (see Table 3). It can be seen also that under different glycerol and yeast extract concentration levels, the microorganism response in a different way in relation to Lipoic Acid concentration, yield and biomass concentration. The experiments had a determination coefficient ( $R^2$ ) of 0.8654 means that 86.54 % of the variation in the Lipoic Acid concentration in the biomass of *Bacillus* spp is attributed to the independent variables. The adjusted  $R^2$  value (0.76446) indicates good relation between the experimental and predicted values of the response. The non-significant of the lack of fit value ( $p=0.300812$ ) revealed that the model is statistically

significant for the response and therefore it can be used for further predictive analysis.

Table 3. Experimental conditions and results obtained from Box-Behnken design matrix with experimental and predicted values of Lipoic Acid concentration by *Bacillus* spp, maintaining constant agitation at 150 rpm

Trial number	Variables Decoded			Lipoic Acid		Biomass	Yield
	Glycerol (mg/mL)	Yeast extract (mg/mL)	Temperature (°C)	mM	g/L	(g/L)	(% p/p)
1	23	15	25	4.1	0.85	23	3.71
2	27	15	25	2.9	0.59	14	4.21
3	23	17	25	4.2	0.88	19	4.63
4	27	17	25	2.2	0.46	22	2.09
5	23	16	20	1.9	0.38	15	2.56
6	27	16	20	2.2	0.46	15	3.04
7	23	16	30	4.9	1.01	23	4.38
8	27	16	30	3.1	0.64	28	2.29
9	25	15	20	1.7	0.35	13	2.68
10	25	17	20	1.9	0.39	13	3.00
11	25	15	30	6.5	1.35	25	5.40
12	25	17	30	4.7	0.97	26	3.71
13	25	16	25	5.2	1.07	22	4.89
14	25	16	25	5.5	1.14	22	5.19
15	25	16	25	6.2	1.29	23	5.62

The three-dimensional response surface plots for Lipoic Acid concentration in *Bacillus* spp biomass are shown in Figures 3-5. Figure 3 depicts the three-dimensional surface plot showing the effects of glycerol and yeast extract on Lipoic Acid concentration in the biomass of the bacteria, while temperature is fixed at its middle level (25 °C). The interaction

relationship between the chosen variables and the response variable were not significant ( $P>0.05$ ). From Figure 3, it could be seen that Lipoic Acid concentration increased gradually with the increasing glycerol and yeast extract. While glycerol was fixed at a low level (23 mg/mL), the effect of the increase yeast extract concentration on the response was

insignificant. Moreover, when yeast extract in medium was fixed at a higher level (17 mg/mL), Lipoic Acid concentration steadily increased with increasing glycerol, but decreased slowly beyond the range (23 – 27 mg/mL). It was evident that the Lipoic Acid was higher when glycerol was in the range of 23 to

25 mg/mL and yeast extract in the range of 15 to 16 mg/mL. Also according to the results, when glycerol was fixed at a middle level (25 mg/mL) and varying the concentration of yeast extract, the effect on the response was greater than, when yeast extract in medium was fixed at a middle level (16 mg/mL).

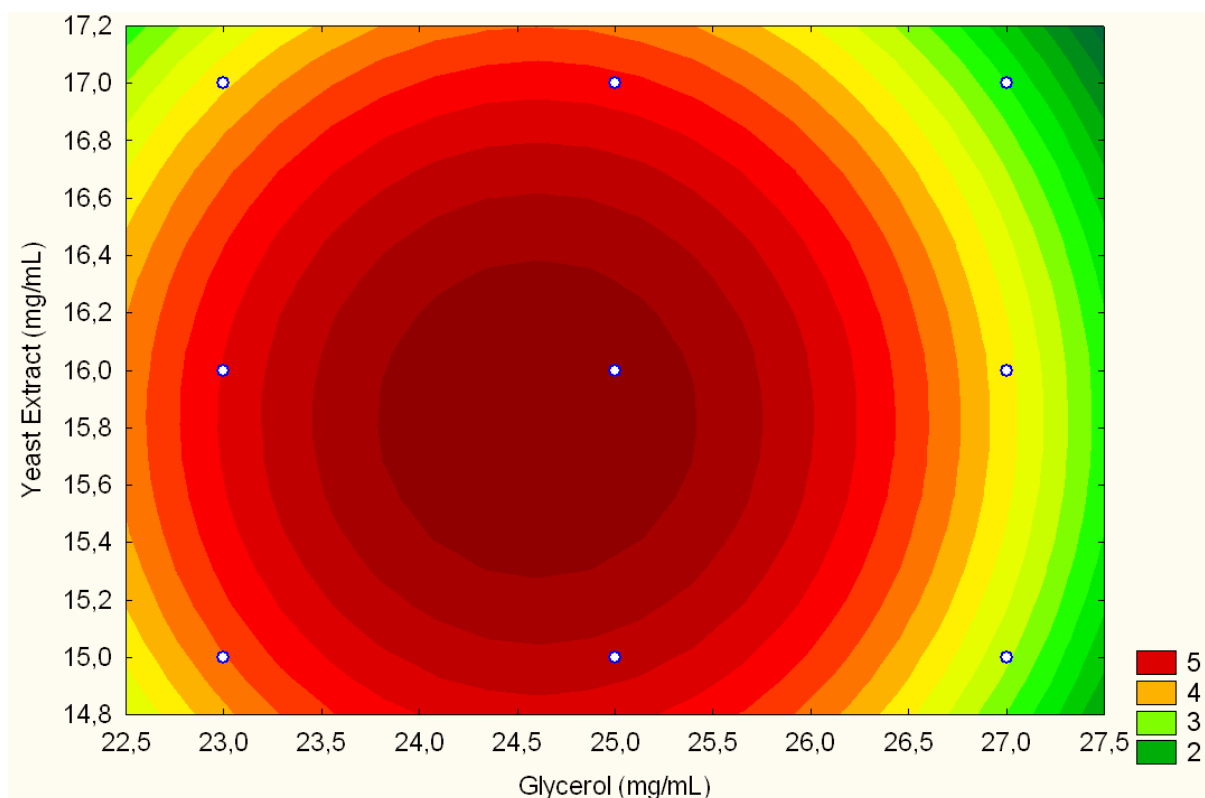


Figure 3. Response surface contour plot of the combined effects of glycerol and yeast extract on Lipoic Acid biosynthesis by *Bacillus* spp using the three factor Box-Behnken design

Figure 4 shows the effects of glycerol and temperature on Lipoic Acid concentration, while yeast extract is fixed at its middle level (16 mg/mL). Similarly, there were no evident interaction relationships existing between the independent variables and the response variable. It was evident that at low temperature

(20 °C), the effect of glycerol on Lipoic Acid concentration was negligible. When the temperature in medium was at higher levels (25 to 30 °C), Lipoic Acid steadily increased with increasing glycerol up to 23 to 25 mg/mL. In this case, the yield of Lipoic Acid could keep a higher level.

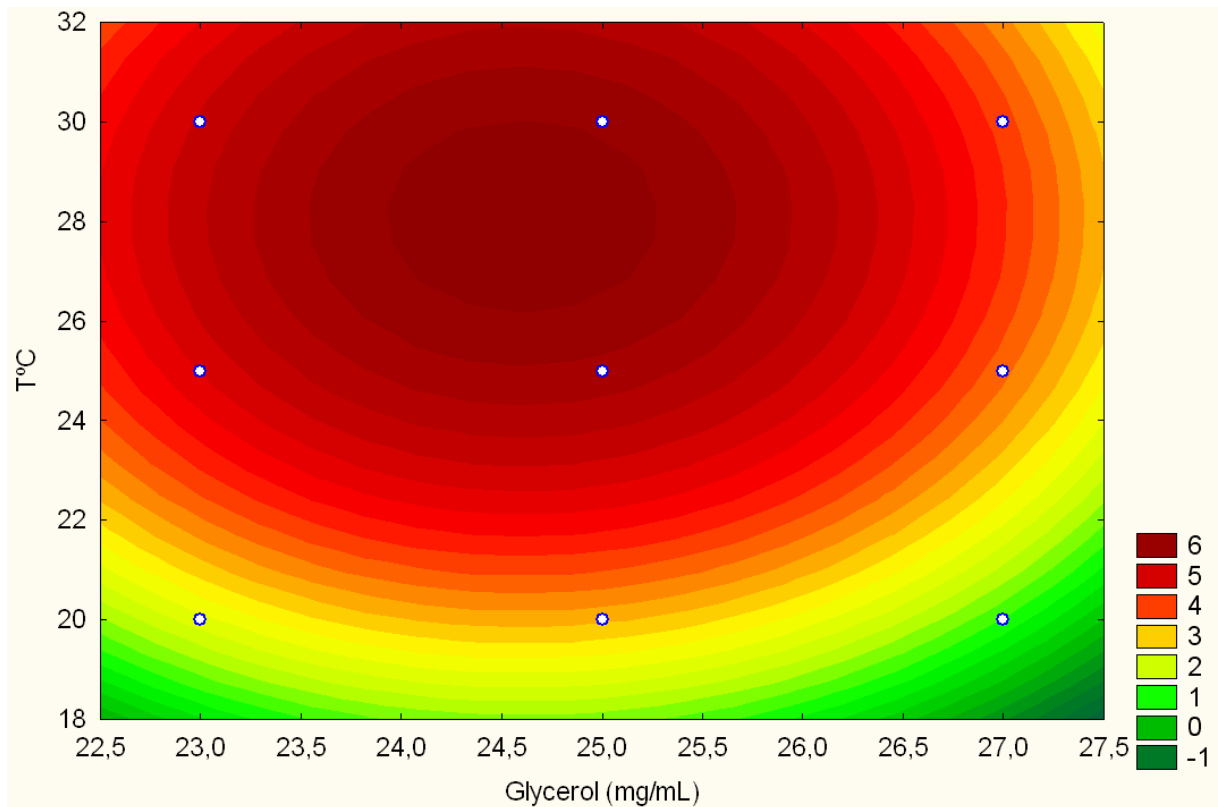


Figure 4. Response surface contour plot of the combined effects of glycerol and temperature on Lipoic Acid biosynthesis by *Bacillus* spp using the three factor Box-Behnken design

Figure 5 shows the effects occurring between yeast extract and temperature, while glycerol is fixed at its middle level (25 mg/mL). Similarly, there were no evident interaction relationships existing between the independent variables and the response variable, due to the high P-value ( $P > 0.05$ ). As could be seen,

when yeast extract and temperature in medium were in the range of 15 to 16 mg/mL and 25 to 30 °C, respectively concentration of Lipoic Acid could keep a high level. Consequently, in order to obtain a good Lipoic Acid concentration in the biomass of the bacteria, the yeast extract and temperature should be kept in a proper range.

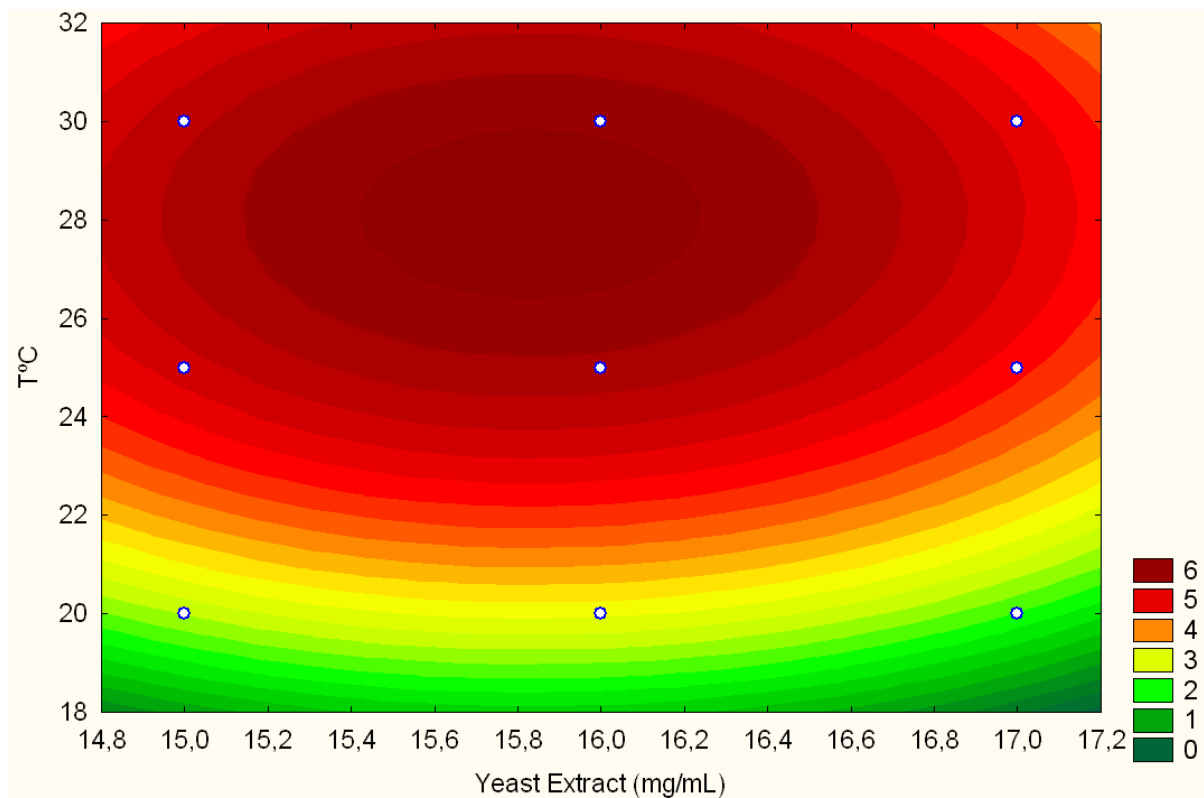


Figure 5. Response surface contour plot of the combined effects of yeast extract and temperature on Lipoic Acid biosynthesis by *Bacillus* spp using the three factor Box-Behnken design

### Validation of the model

Validation of the experiment was repeated under optimal conditions in order to confirm the mathematical model, the maximal of which was 6 mM. This value was found to have a marked increase compared with a lowest value of 1.7mM at run 9 in experiments according to Box-Behnken design.

### Conclusion

Response surface methodology was proved to be a powerful tool for optimization of culture conditions and culture medium composition. Box-Behnken design was employed to evaluate the effects of glycerol, yeast extract and temperature on Lipoic Acid

biosynthesis by *Bacillus* spp. Analysis of contour plots from Box-Behnken design brought the following optimum parameters: glycerol 25 mg/mL, yeast extract 15 mg/mL and temperature at 30 °C. Under these conditions, the predicted and verified concentration of Lipoic Acid in biomass bacteria were 6mM and 6.5mM, respectively, the two of which agreed very well.

### Acknowledgments

Grants and fellowships from the following Brazilian institutions supported this work: Department of Science and Food Technology, Universidade Estadual de Londrina-PR and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education) for financial support.

## Literature Cited

1. Abbas MN, Radwan AA (2007) Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of  $\alpha$ -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine. *Talanta* 74:1113 – 1121
2. Aboul-Enein HY, Hoenen H (2005) Validated Method for Determination of  $\alpha$ -Lipoic Acid in Dietary Supplement Tablets by Reversed Phase Liquid Chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 27: 3029 – 3038
3. Box GEP, Behnken DW (1960) Some new three-level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2: 455 – 75
4. Herbert AA, Guest JR (1975) Lipoic acid content of *Escherichia coli* and other microorganisms. *Arch Microbiol* 106: 259
5. Kataoka H, Hirabayashi N, Makita M (1997) Analysis of lipoic acid by gas chromatography with flame photometric detection. *Meth Enzymol* 279: 166 – 176
6. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C (2002) Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Biochem* 40: 463 – 470
7. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19: (2) 227 – 250
8. Rao KL, Kim CH, Rhee SK (2000) Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochem* 35: 639 – 647
9. Silva CJSM, Roberto IC (2001) Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. *Process Biochem* 36: 1119 – 1124

### 6.3. Artigo 3

## **Avaliação da atividade antioxidante e citotoxicidade do Ácido Lipóico obtido por *Bacillus* spp**

### **Evaluation of antioxidant activity and cytotoxicity of lipoic acid obtained by *Bacillus* spp**

Luiz Rodrigo I. Morioka <sup>1</sup>; Raúl J. H. Castro Gómez <sup>1</sup>; Sandra R. Georgetti <sup>2</sup>, Ilce M. de Syllus Cólus <sup>3</sup>; Priscilla F. Cardoso <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

---

#### **Resumo**

Ácido Lipóico (AL), um derivado dissulfeto do ácido octanóico com papel essencial nas reações de dehidrogenase mitocondrial, tem recebido considerável atenção devido seu potencial antioxidante. Esta atividade ocorre pelo baixo potencial redox do sistema Ácido Lipóico / Ácido Diidrolipóico que participa de reações de neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROS) e na redução de formas oxidadas de outros antioxidantes. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante do Ácido Lipóico extraído de *Bacillus* spp por meio de ensaios utilizando o radical livre estável DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), a deoxirribose e a batofenantrolina. Em todos os ensaios o AL

demonstrou atividade antioxidante concentração-dependente, com IC<sub>50</sub> de 8.1 µg/mL para o DPPH•, 1.4 mg/mL para deoxirribose e 1.04 mg/mL para quelação de ferro utilizando a batofenantrolina. Para a avaliação da citotoxicidade do AL foi realizado testes *in vitro*, nos tempos de 3 h e 24 h de incubação com concentrações de 0.05-22.6 µg/mL, em células epiteliais de hamster chinês (CHO-K1). Os resultados demonstraram que não houve influência na viabilidade celular, apresentado proliferação celular nas diferentes concentrações testadas no tempo de 3h. Por outro lado, no período de incubação de 24 h observou-se um efeito citotóxico somente nas maiores concentrações.

**Palavras-chave:** Ácido Lipóico, *Bacillus* spp, Citotoxicidade, Atividade Antioxidante

### Abstract

---

Lipoic acid (LA), a disulfide derivative of octanoic acid with essential role in mitochondrial dehydrogenase reactions, has received considerable attention because of its antioxidant potential. This activity occurs at low redox potential of the system Lipoic Acid / Acid Diidrolipóico that participates in the neutralization reactions of reactive oxygen species (ROS) and the reduction of oxidized forms of other antioxidants. The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of lipoic acid extracted from *Bacillus* spp by tests using the stable free radical DPPH • (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals), the deoxirribose and bathophenanthroline. In all tests the AL showed antioxidant concentration-dependent, with IC<sub>50</sub> of 8.1 mg / mL for DPPH •, 1.4 mg / mL for deoxirribose and 1.04 mg / mL for iron chelation using bathophenanthroline. To evaluate the cytotoxicity of the LA was performed *in vitro* tests, the times of 3 g / ml, inµh and 24 h of incubation with concentrations of 0.05-22.6 epithelial cells of Chinese hamster (CHO-K1). The results showed no influence on cell viability, cell proliferation presented in different concentrations tested in the time of 3 h. Moreover, the incubation period of 24 h showed a cytotoxic effect only at higher concentrations.

**Keywords:** Lipoic Acid, *Bacillus* spp, Cytotoxicity, Antioxidant Activity



## Introdução

Ácido Lipóico (AL) é um cofator amplamente encontrado em microrganismos procarióticos e eucarióticos (BUSBY et al., 1999) que desempenha um papel central no metabolismo energético. Devido à sua estrutura molecular constituída de oito átomos de carbono e dois átomos de enxofre na região terminal, o AL está envolvido em diferentes reações de óxido-redução nos complexos multi-enzimáticos. Por esta razão, o AL atua como cofator para enzimas envolvidas no processo de conversão de glicose, ácidos graxos e outras fontes de energia em adenosina trifosfato (ATP). Este processo que ocorre a nível mitocondrial envolve o complexo conjunto de reações do ciclo de Krebs. A disponibilidade de Ácido Lipóico a nível celular aumenta a viabilidade do ciclo de Krebs e, conseqüentemente a eficiência de todo o processo (VALLA, 2002).

Considerando seu papel nos processos bioquímicos, o AL foi inicialmente incluído como uma vitamina do complexo B. Entretanto, atualmente este conceito não é mais utilizado, acredita-se que o AL é sintetizado na mitocôndria de humanos e

animais e similarmente em bactérias e células de plantas a partir dos precursores ácido octanóico e cisteína (PATEL; VETTAKKORUMAKANKAV, 1995).

Nas últimas décadas, surgiu um grande interesse nas propriedades farmacológicas do AL, devido ser um exemplo de droga no qual seu efeito terapêutico está relacionado com sua atividade antioxidante que é dependente do tipo de estresse oxidativo e do substrato oxidado (DNA, lipídeos e proteínas) (BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997).

A administração de AL tem demonstrado um efetivo efeito terapêutico como antioxidante em um número de modelos de estresse oxidativo, tais como, isquemia de reperfusão (HARRIS et al., 2009), diabetes (BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997; ZIEGLER; GRIES, 1997), neurodegeneração (PACKER; TRITSCHLER; WESSEL, 1997) e câncer (CHOI; YU; KIM, 2009). Este potencial resulta principalmente do poder redutor do AL e de sua propriedade anfipática, ou seja, o AL é solúvel tanto em água como em lipídeos, sendo uma característica única entre os antioxidantes e por esta razão ele é

conhecido como o antioxidante dos antioxidantes (BILSKA; WLODEK, 2005).

Existem duas categorias básicas de antioxidantes, os sintéticos e os naturais. Restrições ao uso de antioxidantes sintéticos têm sido impostas devido à sua elevada toxicidade (GRICE, 1986; WICHI, 1988). Portanto, o estudo e utilização de antioxidantes eficientes e de origem natural são desejados. O potencial antioxidante do AL sintético tem sido estudado por vários autores (PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995; OU; TRITSCHLER; WOLFF, 1995; BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997; MOINI; PACKER; SARIS, 2002; LI et al., 2004). Entretanto não há descrições na literatura sobre o poder de ação do Ácido Lipóico biológico natural como antioxidante por meio de ensaios específicos.

Considerando as características desejáveis do AL para promover efeito protetor no estresse oxidativo de várias doenças, este trabalho avaliou o potencial antioxidante e a citotoxicidade do ácido lipóico extraído em meio de cultura otimizado para *Bacillus* spp. Os critérios utilizados para avaliar o potencial antioxidante do AL foram, a capacidade de sequestro do radical livre estável DPPH<sup>•</sup> amplamente utilizado para antioxidantes

naturais (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SANCHEZ-MORENO; LAURRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998), a inibição da degradação da deoxirribose por radical hidroxila e a atividade queladora do íon Fe<sup>2+</sup>. A citotoxicidade do AL extraído de *Bacillus* spp para fins como antioxidantes foi avaliada, *in vitro*, em células epiteliais do ovário de hamster chinês (CHOKI).

## Metodologia

### Microrganismo e condição de cultivo

*Bacillus* spp foi obtido do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, e mantida a 5 °C em meio Agar Brain Hearth Infusion (ABHI) inclinado. A bactéria foi cultivada em caldo Brain Hearth Infusion (BHI) sob agitação (120 rpm) a 32 °C durante 24 horas. Após este período, 1.0 mL desta cultura foi inoculada em 50 mL do caldo BHI estéril e incubada por mais 24 horas na mesma condição de cultivo. Após, esta cultura foi diluída em solução salina

(0.85 %) para obter uma concentração de  $3.0 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de acordo com o padrão McFarland nº 1 (MC FADDIN, 1980). Uma alíquota de 0.1 mL da suspensão celular (inóculo inicial) foi inoculado assepticamente em Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio estéril otimizado (glicerol, 25.0 mg/mL e extrato de levedura, 15.0 mg/mL) incubado sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 24 horas.

#### Extração do Ácido Lipóico

Após 24 horas de cultivo, sob as condições descritas anteriormente a cultura foi centrifugada a  $12000 \times g$  por 10 minutos, em seguida a biomassa foi lavada com solução salina (0.85%). Para a extração do AL bacteriano, 0.10 g de biomassa foi colocada em tubo de centrífuga de polipropileno (15 mL) na qual foram adicionados, 1.60 mL de soro albumina bovina ( $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em KOH 2.50 M e 0.40 mL de água destilada. As amostras foram hidrolisadas por 3 horas a 100°C sob vácuo. O hidrolisado, resfriado em banho-maria, foi adicionado de 0.10 mL de 2-mercaptoetanol (solução a 1.0 mg) e 0.80 mL de HCl 6 M. O Ácido Lipóico contido nessa

solução foi extraído com 4.0 mL de diclorometano e o extrato obtido foi evaporado com gás  $\text{N}_2$  (KATAOKA, 1998).

#### Análise cromatográfica

Para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o extrato obtido foi dissolvido em 1.0 mL de NaOH 0.010 M e injetado no aparelho cromatográfico. A determinação de AL foi realizada utilizando a técnica preconizada por Aboul-Enein; Hoenen (2005) com algumas modificações. Utilizou-se bomba LC-10AD (Shimadzu); detector UV-VIS SPD-10A (Shimadzu) ajustado para 332 nm; degaseificador DGU-2A (Shimadzu); injetor de amostra manual (Shimadzu); coluna de fase reversa Ace 5 C18 column (25 cm X 4.6 mm id). A fase móvel consistiu-se de acetonitrila : água (65:35 v/v). O fluxo usado foi de 1.0 mL/minuto. Para avaliação dos dados obtidos, foi utilizado o programa computacional Class-CR10 (Shimadzu). Para a curva de calibração, uma solução estoque padrão de Ácido Lipóico de  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparado dissolvendo 2.06 g de AL (Sigma) em 5.0 mL de  $0.10 \text{ mol L}^{-1}$  de solução de NaOH e completado com tampão

Tris-HCl (pH = 8.5) para um volume de 100 mL. As concentrações de trabalho dos padrões de  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>,  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>,  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>,  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>,  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> and  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> foram preparados por diluições da solução estoque padrão (ABBAS; RADWAN, 2007).

#### Preparo das amostras

O AL, em triplicatas, foi diluído em etanol com obtenção de concentrações finais no meio reacional de 1.40, 2.80, 5.60, 9.80, 14.00, 19.60 e 28.00 µg/mL e 0.49, 0.98, 1.63, 2.45, 3.34 e 4.9 mg/mL para os ensaio de DPPH• e batofenantrolina, respectivamente, enquanto que para o ensaio de deoxirribose a amostra foi diluída em NaOH 0.01M obtendo-se como concentrações finais: 0.34, 0.67, 1.34, 2.68 e 4.9 mg/mL.

Para o estudo da citotoxicidade, células epiteliais de ramster chinês (CHO-K1) foram tratadas com o Ácido Lipóico, diluído em água:etanol (1:1) com obtenção de concentrações finais no meio reacional de 0.05, 0.09, 0.12, 0.15, 0.23, 0.46, 0.57, 0.92, 1.13,

2.26, 2.3, 4.6, 5.65, 11.3 e 22.6 µg/mL com oito replicatas por tratamento.

#### Avaliação da capacidade sequestradora do radical DPPH•

A atividade antioxidante de diferentes concentrações de AL foi determinada pela capacidade doadora de elétrons ao radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BLOIS, 1958). Foram misturados em tubo de ensaio 1.0 mL de tampão acetato 100 mM, pH 5.5, 1.0 mL de etanol, 0.5 mL de solução etanólica de DPPH• 250 µM e 100 µL das amostras. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos e a redução do DPPH• foi monitorada pelo decréscimo da absorvância em 517 nm. O controle positivo não continha AL. A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade doadora de elétrons ao radical DPPH• pelo AL e estimada pela seguinte equação:

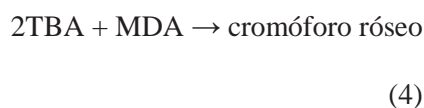
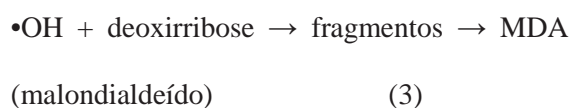
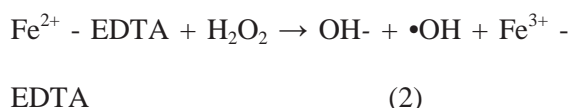
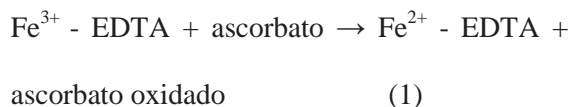
$$\% \text{ de Atividade antioxidante} = 100 - (100 A_a / A_0) \quad (1)$$

onde,  $A_a$  é a absorvância da amostra e  $A_0$  é a absorvância do controle positivo. O valor de  $IC_{50}$  é definido como a concentração final, em  $\mu\text{g/mL}$  das amostras presente na cubeta, necessária para reduzir a concentração inicial de  $\text{DPPH}^\bullet$  em 50%.

Avaliação da atividade sequestradora do radical hidroxila

A eficiência do AL no sequestro do radical hidroxila foi avaliada pela degradação da deoxirribose como descrito por Halliwell et al. (1987), com algumas modificações. Foram misturados em tubos de ensaios 1.0 mL de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$  (20 mM, pH 7.4), 10  $\mu\text{L}$  de ascorbato (100  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de AL, 10  $\mu\text{L}$  de deoxirribose (2,8 mM), 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.0 mM), 10  $\mu\text{L}$  de Fe-EDTA ( $\text{FeCl}_3$  50  $\mu\text{M}$ , EDTA 52  $\mu\text{M}$ ). Os tubos, contendo a mistura de reação, foram incubados a 37 °C por 30 min. Após este período, 1.0 mL de ácido tiobarbitúrico (1 % em NaOH 50 mM), 100  $\mu\text{L}$  de NaOH (10 M) e 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20 %) foram adicionados aos tubos e os mesmos foram incubados a 80 °C por 20 minutos e a absorvância lida em 535 nm (ARUOMA, 1994; SCHINELLA et al.,

2000). No ensaio, ocorreram as seguintes reações:



A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi avaliada, principalmente, como MDA devido à degradação de deoxirribose causada pelo radical hidroxila. A medida foi realizada em 535 nm a temperatura ambiente. Foram feitos o branco (ausência de deoxirribose) e o controle positivo (ausência de AL). Assim, a atividade antioxidante do AL foi expressa como % de inibição da formação do complexo MDA-TBA pelo seqüestro do radical hidroxila e estimada similarmente à Equação (1).

Determinação da atividade queladora do íon  $\text{Fe}^{2+}$

A atividade queladora do íon  $\text{Fe}^{2+}$  pelo AL foi determinada com o ensaio de batofenantrolina (BPS) (BOLANM; ULVIK, 1987). Foram misturados em tubo de ensaio, 2.0 mL do meio de reação (KCl, 130 mM; Tris-HCl, 10 mM; pH 7.4), 10  $\mu\text{L}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  (50  $\mu\text{M}$ ), 20  $\mu\text{L}$  das diferentes concentrações de AL e 10  $\mu\text{L}$  de BPS (0,2 mM). O  $\text{Fe}^{2+}$  e AL foram mantidos em contato por 15 min no meio de reação antes da adição de BPS. Após adição dos reagentes, os tubos contendo a mistura de reação foram mantidos a temperatura ambiente por 15 min. A atividade queladora do íon  $\text{Fe}^{2+}$  foi determinada pela formação do complexo  $\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$ .

A coloração proveniente da reação foi lida em 530 nm e 700 nm (CASAGRANDE et al., 2006). Foram feitos o branco (meio de reação) e o controle positivo (meio de reação +  $\text{Fe}^{2+}$  + BPS). A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade queladora do

íon  $\text{Fe}^{2+}$  pelo AL e estimada similarmente à Equação (1).

#### Citotoxicidade

A citotoxicidade do Ácido Lipóico extraído de *Bacillus* spp foi avaliado através da viabilidade das células CHO-K1 pelo teste do MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo] conforme descrito por Mosmann (1983). As células CHO-K1 foram tratadas com diferentes concentrações de ácido lipóico (Figura 4) em dois tempos de exposição, 3h e 24h.

#### Análises estatísticas

Para a atividade antioxidante, os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni realizados pelo software GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 4.00 3 de abril de 2003. Os resultados serão considerados significativamente diferentes para  $P < 0.05$ . As concentrações de AL que inibem o processo oxidativo em 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) foram estimadas pelo mesmo software

utilizando uma curva hiperbólica (one site binding hyperbola).

Para a citotoxicidade, os resultados dos tratamentos foram analisados por ANOVA e comparados ao controle através do teste de Dunnet.

### **Resultados e Discussão**

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais populares de análise que pode ser usado em combinação com vários sistemas de detecção, tais como radiação ultravioleta (UV), fluorescência (FL) e eletroquímico (CE). No entanto, poucos trabalhos têm sido feitos sobre a determinação do AL por CLAE (KATAOKA, 1998). Um método validado para a determinação de AL em cápsulas suplementares foi descrito por Aboul-Enein; Hoenen (2005). De acordo com os dados obtidos o AL apresentou-se como um pico característico com um tempo de retenção de 6 minutos. O AL foi estável não havendo decomposição durante as análises. A curva de calibração ( $R^2 = 0.9993$ ) relacionando a área do pico obtido com a concentração do AL foi

linear na faixa de 0.02 - 2063.0 mg/mL. O limite de detecção do AL foi 0.01 mg/mL.

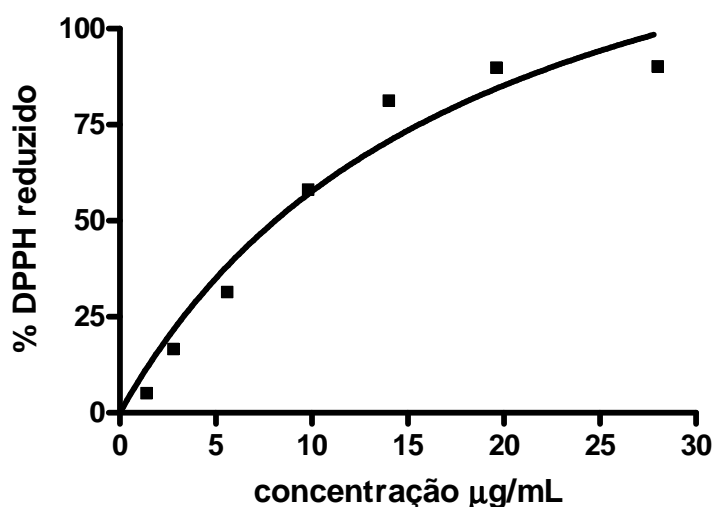
Muitos critérios devem ser considerados quando se avalia o potencial antioxidante de um composto. Alguns destes incidem sobre os aspectos químicos e bioquímicos. O combate de radicais livres, quelante de metais, caráter anfifílico, biodisponibilidade e segurança, interação com outros antioxidantes e regeneração metabólica são critérios importantes na consideração de um composto como um potente antioxidante. Ácido Lipóico preenche tais critérios, tornando-o um antioxidante ideal (PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995).

Sabe-se que *in vitro*, a atividade antioxidante do AL é determinada pela sua concentração e pelas suas propriedades antioxidantes, tais como: habilidade de sequestrar EROS, capacidade de quelar metal, habilidade de regenerar antioxidantes endógenos e habilidade de reparar danos oxidativos (BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997 a). Assim, a atividade antioxidante do Ácido Lipóico biológico foi avaliada por diferentes métodos uma vez que o estresse oxidativo depende do tipo de dano gerado, de como é gerado, da sua localização assim como

do alvo oxidativo avaliado. (GEORGETTI et al., 2006).

O Ácido Lipóico obtido de *Bacillus* spp apresentou elevada atividade sequestradora/doadora de elétrons ao radical livre DPPH• e essa ação demonstrou-se concentração-dependente (1.4 a 28.0 µg/mL) (Figura 1). O potencial do AL foi expresso como concentração final necessária para reduzir a concentração inicial do radical

DPPH• em 50 % (IC<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra, menor será seu IC<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante. O valor de IC<sub>50</sub> do AL para esse ensaio foi de 8,1 µg/mL e a maior capacidade sequestradora foi alcançada com concentração de 19.6 µg/mL (aproximadamente 90 % de redução do DPPH•), observando-se em concentração superior um efeito platô.



**Figura 1.** Atividade sequestradora/doadora de elétrons do Ácido Lipóico ao radical estável DPPH•. Resultados expressos como média ± SEM

A interação de íons de metais de transição com peróxido de hidrogênio em sistemas biológicos pode levar à formação de espécies radiculares altamente reativas, como o radical hidroxila (DI MAMBRO; FONSECA, 2005). Assim, a eficiência do AL no sequestro

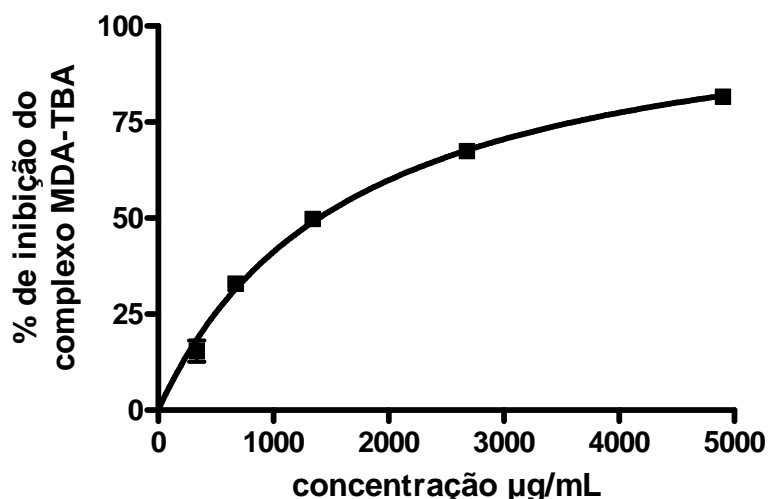
do radical hidroxila foi avaliada pelo ensaio com o açúcar deoxirribose que é degradado quando exposto ao radical hidroxila, gerado por irradiação ou por reação tipo Fenton (decomposição dependente de íon ferro) (HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA,



1987). Portanto, a capacidade do AL obtido por *Bacillus* spp foi determinada pela inibição da formação de MDA gerado pela degradação da deoxirribose por reação de Fenton (Fe(III)-EDTA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de ascorbato).

Na Figura 2, observa-se que o AL inibiu a degradação da deoxirribose e subsequentemente a formação de MDA de forma concentração-dependente (0.33 – 4.9

mg/mL). A atividade antioxidante máxima foi de 81% na concentração de 4.9 mg/mL e o valor de IC<sub>50</sub> para o seqüestro de radical hidroxila foi de 1.4 mg/mL. Estes resultados demonstraram que o AL biológico apresentou eficiente atividade sequestradora do radical hidroxila que é uma espécie reativa de oxigênio altamente deletéria as biomoléculas.



**Figura 2.** Inibição da degradação da deoxirribose em diferentes concentrações de Ácido Lipóico. Resultados apresentados como inibição da formação do complexo MDA-TBA (ácido tiobarbitúrico). Resultados expressos como média  $\pm$  SEM

Uma das características do radical hidroxila é a formação de outras espécies com menor reatividade, quando em contato com outras moléculas biológicas, como proteínas, ácidos graxos em membranas e DNA (ARUOMA, 1999). Um antioxidante poderá interferir com danos causados pelo radical

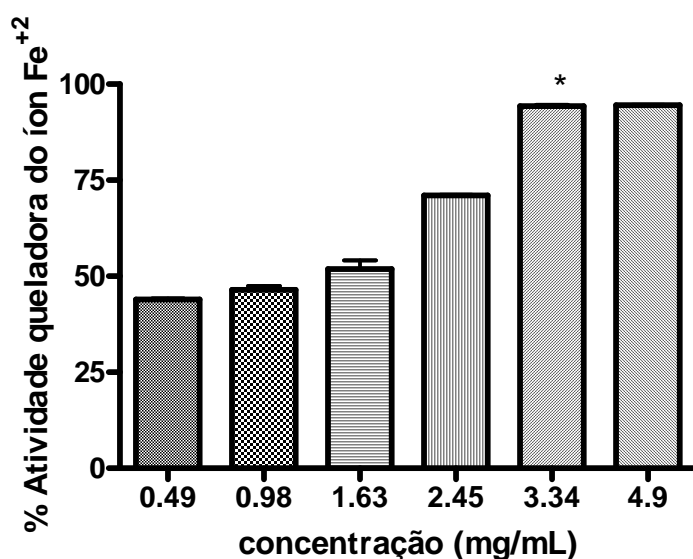
hidroxila não somente pelo seqüestro do radical, mas pelo sequestro ou bloqueio dos precursores de sua formação (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio) e/ou pela quelação de íons metais de transição (HALLIWELL et al., 1995). Portanto, o AL obtido por *Bacillus ssp* poderá apresentar um

potencial contra o radical hidroxila *in vivo* devido as atividades sequestradora de radical e queladora de íon ferro, como confirmado nesta investigação com os ensaios de deoxirribose e de batofenantrolina (BPS).

A capacidade de quelar metal do Ácido Lipóico biológico foi testada mediante sua habilidade em competir com a batofenantrolina (BPS) por íon ferro. A Figura 3 mostra que na presença de AL a formação do complexo BPS-Fe<sup>+2</sup> foi inibida fortemente mesmo na concentração mais baixa (aproximadamente 44%), porém houve um aumento estatisticamente significativo ( $P < 0.05$ ) quando utilizou-se a concentração de 3.34 mg/mL, alcançando uma atividade queladora máxima

do íon ferro de aproximadamente 94 %. Entretanto, ao utilizar uma concentração maior de AL no meio reacional (4.9 mg/mL) não se observou aumento da inibição da formação do complexo BPS-Fe<sup>+2</sup>, uma vez que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as percentagens de atividade queladora encontradas entre as concentrações. O valor de IC<sub>50</sub> encontrado para esse ensaio foi de 1.04 mg/mL.

Estes resultados indicaram que o AL pode ter ação protetora contra os danos causados pelo radical hidroxila *in vivo*, por sua atividade sequestradora de radical ou sua capacidade de quelar o íon ferro.



**Figura 3:** Atividade quelante do AL em diferentes concentrações. Resultados são representados pela média  $\pm$  SEM. \* diferença estatística significativa em relação as menores concentrações ( $P < 0.05$ )

Nos últimos anos, os antioxidantes naturais, têm sido intensivamente utilizados para prevenir os danos oxidativos, além disso, eles podem ser obtidos facilmente e geralmente apresentam efeitos colaterais leves ou insignificantes (LIU; XIAO, 1994).

O efeito citotóxico de diferentes concentrações do AL obtido de *Bacillus ssp* foi avaliado pelo teste do MTT. O MTT é um corante amarelo que é convertido em formazan, um composto violeta, por meio da atividade da enzima succinato desidrogenase da mitocôndria. Uma vez que a conversão ocorre em células vivas, a quantidade de formazan produzido está diretamente relacionada com o número de células viáveis presentes.

Na Figura 4, observou-se que as diferentes concentrações de Ácido Lipóico, no tratamento de 3 h, não apresentaram efeitos citotóxicos. Além disso, os resultados obtidos demonstraram que não houve aumento significativo ( $P>0.05$ ) na atividade mitocondrial em células CHO-K1 nas concentrações de 0.05 – 4.6  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, verificou-se que a partir da concentração de 5,65  $\mu\text{g/mL}$  ocorreu um aumento na atividade mitocondrial nas células

CHO-K1 de aproximadamente 45 % em relação ao controle ( $P<0.05$ ), sugerindo uma proliferação celular.

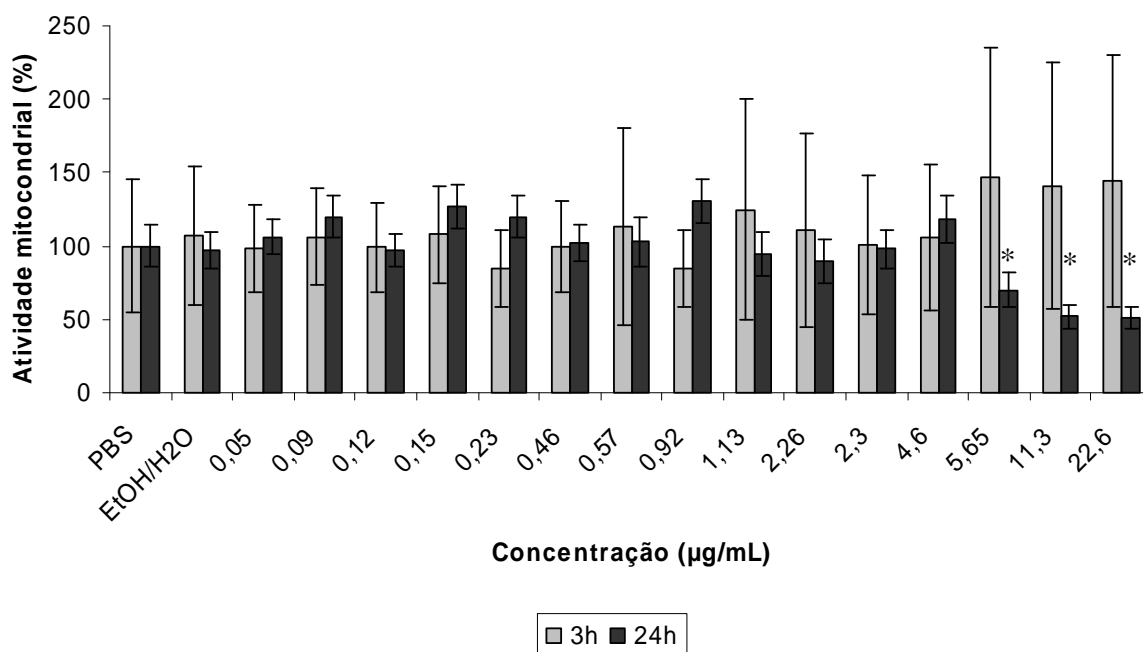
No tratamento por 24 h até a concentração de 4,6  $\mu\text{g/mL}$  de AL não ocorreu uma diminuição significativa ( $P<0.05$ ) na atividade mitocondrial em células CHO-K1. Entretanto, o AL causou um decréscimo na viabilidade celular de 70 % em 5.65  $\mu\text{g/mL}$  e de aproximadamente 51 % nas concentrações de 11.3 e 22.6  $\mu\text{g/mL}$ , indicando citotoxicidade (Figura 4). Os resultados obtidos sugerem que o AL apresenta citotoxicidade somente em concentrações elevadas e por tempo de incubação de 24 h.

De acordo com os resultados, o AL obtido do *Bacillus ssp* apresentou potencial antioxidante confirmado pela atividade sequestradora de radicais livres, observado pelos ensaios de DPPH<sup>•</sup> e deoxirribose, e atividade queladora de metais, por meio do ensaio da batofenantrolina. As atividades antioxidantes foram dependentes da concentração em todas as metodologias testadas. Entretanto, observaram-se valores de  $\text{IC}_{50}$  diferentes dependendo do radical gerado.

Neste estudo o Ácido Lipóico extraído de *Bacillus ssp* não apresentou efeito

citotóxico quando em concentrações menores que 5.65 µg/mL. O AL não é cumulativo nos tecidos quando administrado em quantidades apropriadas para fins preventivos ou terapêuticos.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o Ácido Lipóico obtido de *Bacillus* ssp pode ser utilizado para prevenir danos oxidativos causados por radicais livres.



**Figura 4.** Avaliação da citotoxicidade (MTT) em células CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações de Ácido Lipóico por 3 e 24 h. Os dados representam médias da atividade mitocondrial (%) e as barras denotam o desvio-padrão correspondentes à três experimentos individuais. PBS: salina tamponada com fosfato; \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $P < 0.05$ ), conforme determinado pelo teste de Dunnet

## Agradecimentos

Ao Programa de Mestrado e Doutorado do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina-PR e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido.

## Referências

- ABBAS, M. N.; RADWAN, A. A. Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of  $\alpha$ -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine. *Talanta* v. 74, p. 1113 – 1121, 2007
- ABOUL-ENEIN, H. Y.; HOENEN, H. Validated Method for Determination of  $\alpha$ -Lipoic Acid in Dietary Supplement Tablets by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* v. 27, p. 3029 – 3038, 2005
- ARUOMA, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in enzymology* v. 233, p. 57 – 66, 1994
- ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* v. 8, p. 53 – 63, 1999
- BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. *General pharmacology* v. 29, n. 3, 315 – 331, 1997
- BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R.; BAST, A. The role of lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy. *Drug metabolism reviews* v. 29, p. 1025 – 1054, 1997
- BIEWENGA, G.P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid. *General pharmacology* v. 29, n. 3, p. 315 – 331, 1997 a
- BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacological Reports* v. 57, p. 570 – 7, 2005

- BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* v. 181, p. 1199 – 1200, 1958
- BOLANM, B. J.; ULVIK, R. J. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. *The Biochemical journal* v. 243, n. 1, p. 55 – 59, 1987
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm-Wiss Technologie* v. 30, n. 6, p. 609 – 615, 1997
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technologie* v. 28, p. 25 – 30, 1995
- BUSBY, R. W.; SCHELVIS, J. P. M.; YU, D. S.; BABCOCK, G. T.; MARLETTA, M. A. Lipoic acid biosynthesis: LipA is an iron-sulfur protein. *Journal of the American Chemical Society* v. 121, p. 4706 – 4707, 1999
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI Jr, W. A.; JABOR, J. R.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical Formulations by its Antilipoperoxidative Activity. *Journal of pharmaceutical science and technology* v. 7, n. 1, 2006
- CHOI, S. Y.; YU, J. H.; KIM, H. Mechanism of alpha-lipoic acid induced apoptosis of lung cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* v. 1171, p. 149 – 55, 2009
- DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical* v. 37, p. 287 – 295, 2005
- GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VICENTINI, F. T. M. C.; VERRI Jr, W. A.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical

- formulations. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* v. 64, p. 99 – 106, 2006
- GRICE, H. C. Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology* v. 24, p. 1127 – 1130, 1986
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. *Food and chemical toxicology* v. 33, p. 601 – 617, 1995
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple “test tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical biochemistry* v. 165, p. 215 – 219, 1987
- HARRIS, R. A.; NISHIYAMA, S. K.; WRAY, D. W.; TEDJASAPUTRA, V.; BAILEY, D. M.; RICHARDSON, R.S. The effect of oral antioxidants on brachial artery flow-mediated dilation following 5 min 10 min of ischemia. *European journal of applied physiology* v. 107, p. 445 – 53, 2009
- KATAOKA, H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B* v. 717, p. 247 – 262, 1998
- LI, Y.; ZHAO, Y.; YU, W.; JIANG, S. Scavenging ability on ROS of alpha-lipoic acid (ALA). *Food Chemistry* v. 84, p. 563 – 567, 2004
- LIU, J.; XIAO, P. G. Recent advances in the study of antioxidative effects of Chinese medicinal plants. *Phytotherapy research* v. 8, p. 445 – 451, 1994
- MC FADDIN, J. F. Mc Farland’s nephelometer standards. 2<sup>nd</sup> edn, p 482. Willians & Wilkins, 1980
- MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N. E.L. Antioxidant and Prooxidant Activities of  $\alpha$ -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicology and applied pharmacology* v. 182, p. 84 – 90, 2002
- OU, P.; TRITSCHLER, H. J.; WOLFF, S. P. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant ? *Biochemical pharmacology* v. 50, n. 1, p. 123 – 126, 1995

- PACKER, L.; TRITSCHLER, H. J.; WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. *Free radical biology & medicine* v. 22, p. 359 – 78, 1997
- PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology & medicine* v. 19, n. 2, p. 227 – 250, 1995
- PATEL, M. S.; VETTAKKORUMAKANKAV, N. N. Lipoic acid-requiring proteins: recent advances. In: *Biothiols in Health and Disease*. Ed. Packer L, Cadenas E, Marcel Dekker Inc., New York, 373 – 388, 1995
- SANCHEZ-MORENO, C.; LAURRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A. Procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry* v. 76, n. 10, p. 270 – 276, 1998
- SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and biophysical research communications* v. 269, p. 357 – 360, 2000
- VALLA, A. P. C. Acido alfa lipoico unicita di una molecola antiossidante. *Applied Metabolics* v. 24, 2002  
[http://www.olympian.it/am/24\\_1.cfm](http://www.olympian.it/am/24_1.cfm)
- WICHI, H. P. Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisol (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and chemical toxicology* v. 26, p. 717 – 723, 1988
- ZIEGLER, D.; GRIES, F. A. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy. *Diabetes* v. 46, n. 2, p. 62 – 66, 1997



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização de metabólitos e/ou componentes bioativos por meio da fermentação microbiana é uma alternativa eficaz para se estudar o comportamento do microrganismo. Dessa forma, neste trabalho verificou-se que diferentes fontes de carbono e nitrogênio afetam o metabolismo do *Bacillus* spp na produção de Ácido Lipóico. De modo que quando a bactéria foi cultivada com 25 mg/mL de glicerol e 15 mg/mL de extrato de levedura a 30 °C, 150 rpm durante 24 horas observou-se uma maior concentração de Ácido Lipóico. O Ácido Lipóico extraído da biomassa de *Bacillus* spp apresentou atividade antioxidante a diversos radicais livres tais como, o radical orgânico DPPH, radical hidroxila e ao íon ferro ( $Fe^{2+}$ ). Quanto à citotoxicidade o Ácido Lipóico não apresentou efeito citotóxico quando em concentrações menores que 5.65 µg/mL. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o Ácido Lipóico obtido de *Bacillus* spp pode ser utilizado para prevenir danos oxidativos causados por radicais livres.

## 8. ANEXOS

### 1. Normas Editoriais para Publicação: Semina

#### Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados em disquete (3 ½ ), acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2. Categorias dos Trabalhos:

- a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;
- b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;
- c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e

3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPES.

3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2. *Nome(s) completo(s) do(s) autor(es)*: Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT).

3.4. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

3.10. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

3.11. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.

5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "*Ad hoc*" da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.

6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista.

7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.

8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

9. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Edição da SEMINA

Campus Universitário - Caixa Postal 6001

86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil.

Contatos com a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação:

## 2. Normas Editoriais para Publicação: Current Microbiology

### Instructions for Authors Manuscript Submission

Current Microbiology accepts electronically processed manuscripts through its online center, Manuscript Central. Authors should submit their article to:

<http://mc.manuscriptcentral.com/cm>

Authors should upload BLINDED text, tables and figures through Manuscript Central. The format of your manuscript should follow the format outlined below. Since all original submissions are BLIND-reviewed, please exclude all author and affiliation information from the text of your manuscript. All author communications and information can be separately included in the Manuscript Central "Author Comments" section (for Editors' viewing only), or uploaded as a separate "File Not For Review." After your manuscript is submitted, the Editors will inspect the submission online and assign reviewers. Only assigned reviewers will be able to view and print the uploaded, blinded electronic manuscript.

### System Requirements

Authors will need the following in order to use Manuscript Central:

Netscape 4.x or MS Internet Explorer 4.x/5.x  
Adobe Acrobat Browser plug-in  
Electronic files of the article text  
Electronic files of the article graphics (scanned or exported)

### Author Accounts

Authors entering the journal's Manuscript Central site for the first time can create a new account and then follow the online prompts in order to submit a manuscript. If you have previously logged in to the system, you should use your existing account for ALL subsequent submissions. If this procedure is followed and you use one primary account, then you will be able to track the status of all of your submitted manuscripts from the same page.

### Getting Started

Once you have logged in to your account, Manuscript Central will lead you through a step-by-step submission process. When submitting your manuscript on Manuscript Central, you will be required to enter data through several different screens. The requested information will include title, subtitle, author names and affiliations, and so forth. Support for special text characters is available. At any point during your submission process, Help buttons and a support link are available to view common questions, or ask specific questions via email. If you cannot finish your submission in one visit, you can save a draft and later re-enter the process at the same point for that manuscript by clicking on the "Partially Submitted Manuscripts" button in the Submission Center.

### Uploading Files

The electronic file should contain all text and table sections of the manuscript as one file. Electronic files can be uploaded as PDF, PostScript or RTF. For review purposes only, figures may be imbedded in PDF and PostScript files (PostScript files are converted by the system into PDF so that Editors and

reviewers may share them). RTF (Rich Text Format) is a common export property of most popular word processors. Check your word processor to see if it can export or “Save As” your file in RTF format. MS Word and WordPerfect both contain this function. After uploading the RTF for text, you will be prompted for uploading graphics. Common graphics files such as GIF, JPEG, EPS, TIFF are supported (please use TIFF for accepted manuscripts). It is requested that very large figure files be compressed as much as possible before uploading them to the website. After uploading the parts of the article in this manner, the system will convert the files to PDF. You will see the result of the conversion with the Acrobat plug-in in your browser. **ALWAYS KEEP COPIES OF YOUR WORDPROCESSING AND GRAPHICS FILES.** You may want to revise the manuscript during the review process and you will need the original files if your manuscript requires revisions. At any point during your submission process, Help buttons and a support link are available to view common questions, or ask specific questions via email. After you submit your manuscript you will be notified by email that your submission was successful.

### Graphics Quality

If you are submitting electronic graphics that you have scanned, be prepared to send the hard copy originals upon request. While the electronic files you have created are satisfactory for the review process, they will not be of sufficient quality for printing. This also holds true for files created in low-resolution graphics environments such as MS PowerPoint, etc.

### Required Forms

Certain forms may be required upon submission, or acceptance, of your manuscript. These forms can be found under the icon “Instructions and Forms” in the upper-right-hand corner of the Manuscript Central screen. As soon as your manuscript has been submitted online, the “Mandatory Copyright Form” must be printed out, signed and sent to the CM Editorial Office (see address below). Other forms, including the permissions form and the color printing form, may also be necessary if the manuscript is accepted for publication.

### Keeping Track

After submission, you may return periodically and monitor the progress of your submission through the review process. Be sure to enter the same User Name and Password that you originally used to submit your manuscript.

### Review and Action

The editorial staff will examine the manuscripts for accuracy and completeness, and will customarily send a manuscript to two or three reviewers, depending on the manuscript type. Authors will be notified as to the acceptability of a manuscript as rapidly as possible.

### Permissions

A written statement must accompany materials that are taken from other sources and included in the submitted manuscript. Both author and publisher must approve the statement and give permission to Current Microbiology for print and electronic reproduction. A “Request for Permission Form” can be downloaded and printed from the “Instructions and Certain forms may be required upon submission, or acceptance, of your manuscript. These forms can be found under the icon “Instructions and Forms” in the upper-right-hand corner of the Manuscript Central screen. As soon as your manuscript has been submitted online, the “Mandatory Copyright Form” must be printed out, signed and sent to the CM Editorial Office (see address below). Other forms, including the permissions form and the color printing form, may also be necessary if the manuscript is accepted for publication.

### Keeping Track

After submission, you may return periodically and monitor the progress of your submission through the review process. Be sure to enter the same User Name and Password that you originally used to submit your manuscript.

### Review and Action

The editorial staff will examine the manuscripts for accuracy and completeness, and will customarily send a manuscript to two or three reviewers, depending on the manuscript type. Authors will be notified as to the acceptability of a manuscript as rapidly as possible.

### Permissions

A written statement must accompany materials that are taken from other sources and included in the submitted manuscript. Both author and publisher must approve the statement and give permission to Current Microbiology for print and electronic reproduction. A "Request for Permission Form" can be downloaded and printed from the "Instructions and Forms" section of the online center, Manuscript Central. Copyrights can also be downloaded from the "Instructions and Forms" section of Manuscript Central. If your manuscript is accepted, other hard copy items may also be requested later by the editor.

**FOR ALL MANUSCRIPT QUERIES, SUBMISSION INSTRUCTIONS AND COPYRIGHT FORMS, PLEASE CONTACT:**

Ms. Jolantha Swiderski  
Current Microbiology Editorial Office  
DSMZ  
Mascheroder Weg 1B  
38124 Braunschweig, Germany  
Tel: 011 49 531 2616 - 100  
Fax: 011 49 531 2616 418  
email: [jolaswiderski@aol.com](mailto:jolaswiderski@aol.com)

### Special Characters

The Journal does not assume responsibility for errors in conversion of customized software, newly released software, and special characters. Please indicate if any special characters are used in the file (e.g. Greek, math symbols) by using a symbol code (e.g. ga for Greek alpha), and defining these codes at the end of your paper.

### Organization of Manuscripts

Manuscripts must be no longer than 12 pages in length, inclusive of figures and tables. Please type manuscripts (including references) double-spaced with one-inch wide margins.

### Manuscript Format I

**Title Page.** This page should be submitted separately from the blinded text of the manuscript and should include:

The title of the article.

The complete names and academic degrees for each contributing author (first name, middle name initial [s], surname, degree [s]).

The department and institutional affiliations with complete street or mailing addresses for each contributing author. Include the city, state or province, and country where the work was performed.

“Correspondence to” followed by the name and contact information for the corresponding author, and Corresponding fax and telephone numbers and email address (required). A short title for use as a running head (not to exceed 30 characters in length, including spaces between words). Any grant information, and at the bottom of the title page, indicate any acknowledgement of grant support.

In a separate submission, include the remaining manuscript text and tables.

**Abstract.** Begin with a one paragraph abstract of not more than 250 words. Make sure to include the manuscript title at the top of this page. The Abstract should be a factual, not descriptive, statement of the objectives of the study, methods, principal results and conclusions, and should not cite any references. Do not include any headings. Spell out each abbreviated term in full and follow with the abbreviation the first time a particular term is used; for example, ultrasound (US).

**Text.** Organize the text into an Introduction section that conveys the background and purpose of the report, and then into sections titled “Materials and Methods,” “Results” and “Discussion.” When required by the nature of the report, manuscripts that do not follow this specific format may be accepted.

**Acknowledgements.** Individuals, other than authors, who were of direct help in the reported work should be acknowledged by a brief statement on a separate page immediately following the text. Each acknowledged person should give their written consent to being named in the manuscript. This consent is to be sent with the submitted manuscript to the Editor.

**References.** Please type references double-spaced. References should appear in alphabetical order, numbered consecutively with Arabic numbers. Once a reference is cited, all subsequent citations should be to the original number. All references must be cited in the text or tables. Papers that have been accepted for publication or are in press may be listed in the References, but the Journal does not reference unpublished data and personal communications. Use the form for references adopted by the U.S. National Library of Medicine, as in Index Medicus. If several references are available on the same subject, cite only the most recent and pertinent, giving preference to original articles over review articles or textbooks.

[1] An K, Urban DB.... as listed on page 4 [2] Faith WT, Neubeck CE .... as listed on page 4 [3] Gottschalk G (1986) ....as listed on page 4

In references to journal ARTICLES, please include (1) surname and initials (without periods) of first three authors and et al. for all others, (2) year in parentheses, (3) article title, (4) abbreviated journal name, (5) volume number, (6) inclusive page numbers, in that order. An example follows:

An K, Urban DB, Urban JE, Johnson TE (2003) A mammalian cell regulatory agent, CeReS- 18, inhibits yeast cell proliferation but not bacterial replication. *Curr Microbiol* 46:353-358 In references to BOOKS, please include (1) surname and initials (without periods) of first three authors and et al. for all others, (2) year in parentheses, (3) chapter title, if any, (4) editor(s), if any, (5) city of publication, (6) publisher, (7) inclusive page numbers. Volume and edition numbers, and name of translator should be included when appropriate.

Examples follow:

Gottschalk G (1986) *Bacterial metabolism*. 2nd edn. New York, Springer-Verlag Faith WT, Neubeck CE, Reese ET (1971) *Production and application of enzymes*. In: Ghose TK, Fiechter A (eds) *Advances in biochemical engineering*, vol. 1. Berlin, New York, Springer-Verlag, pp 77-111

**Tables.** All tables should be included at the end of the manuscript text. Type each table double spaced on a separate page, number the tables consecutively with Arabic numbers and include a brief title at the top, as well as a footnote explaining any abbreviations used in the body of the table. All tables must be cited in the text.

Figure Legends. Also include the figure legends at the end of the manuscript text. Type the legends for figures double spaced, and number the legends consecutively with Arabic numbers.

Figures. Figures should be restricted to the minimum necessary to clarify the work described. Please make sure that the original illustrations are professionally drawn or photographed as black and white glossy prints of high quality. Submit common graphic files such as GIF, JPEG, EPS, TIFF (please use TIFF for accepted manuscripts). It is requested that very large figure files be compressed as much as possible before uploading them to the website. After uploading the parts of the article in this manner, the system will convert the files to PDF. You will see the result of the conversion with the Acrobat plug-in in your browser. Symbols, letters and numbers should be of sufficient size to be clearly recognizable, if published. If hard copy figures are requested, please paste a label on the back of each figure, indicating the figure number, name of first author and the top of the figure. Figures in accepted manuscripts will not be returned unless a written request accompanies page proofs. More specific details can be found below regarding figures under "Guidelines for Electronically Produced Illustrations for Print."

Publication of Color Illustrations: The journal will consider a limited number of color illustrations for publication, but the author must bear the full costs of color print reproduction. Payment details for color publication can be found in the "Color Printing Form," which is located under the icon "Instructions and Forms" in the upper-right-hand corner of the Manuscript Central Screen. Color can be used without charge for the electronic edition of the journal but will appear in the printed version of the journal at the author's expense: US\$1150 for all color within the same article.

Scales. As the size at which an illustration is printed is invariably different from that of the original, scale-bars should not be used in place of magnifications or ratio scales. Footnotes: Enter footnotes into text by placing a superscript Arabic numeral on the page where they appear, and then indicating footnotes at the end of the manuscript. Consecutively number the footnotes throughout the manuscript. Indicate footnotes to tables by superscript lowercase letters.

Abbreviations, Drug Names, Digits. Please use the standard abbreviations and units listed in *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors and Publishers, Sixth Edition* (Reston, Va., Council of Biology Editors, 1994). The first time an uncommon abbreviation appears in the text, it should be preceded by the full name for which it stands. Generic names for drugs and chemicals should be used the first time the drug or chemical is mentioned in the text and, preferably, thereafter. If an author wishes, the trade name may be inserted in parentheses following the generic name the first time the generic name appears, and the manufacturer name and city should also be included. Please express digits as numerals except when they are the first word in a sentence, and decimals should be written in North American format. Express units of measurement in the metric system whenever possible, and abbreviate them when used with numbers.

## **Guidelines for Electronically Produced Illustrations for Print**

### General

Send illustrations separately from the text (i.e. files should not be integrated with the text files). Always send printouts of all illustrations.

### Vector (line) Graphics

Vector graphics exported from a drawing program should be stored in EPS format. Suitable drawing program: Adobe Illustrator. For simple line art the following drawing programs are also acceptable: Corel Draw, Freehand, Canvas.

No rules narrower than .25 pt.

No gray screens paler than 15% or darker than 60%.

Screens meant to be differentiated from one another must differ by at least 15%.



#### Spreadsheet/Presentation Graphics

Most presentation programs (Excel, PowerPoint, Freelance) produce data that cannot be stored in an EPS format. Therefore graphics produced by these programs cannot be used for print.

#### Halftone Illustrations

Black and white and color illustrations should be saved in TIFF format. Illustrations should be created using Adobe Photoshop whenever possible.

#### Scans\*

Scanned reproductions of black and white photographs should be provided as 300 ppi TIFF files.

Scanned color illustrations should be provided as TIFF files scanned at a minimum of 300 ppi with a 24-bit color depth.

Line art should be provided as TIFF files at 600 ppi.

\* We do prefer having the original art as our printers have drum scanners which allow for better reproduction of critical medical halftones. Upon acceptance of a manuscript, please be ready to provide original hard copies if electronic files are unavailable.

#### Graphics from Videos

Separate files should be prepared for frames from a video that are to be printed in the journal. When preparing these files you should follow the same rules as listed under Halftone Illustrations.

### **Guidelines for Electronically Produced Illustrations for ONLINE**

#### Video

MPEG (.mpg) is the preferred format, but .rm, .avi, .mov, etc. are acceptable.

No video file should be larger than 2MB. To decrease the size of your file, consider changing one or more of the following variables: frame speed, number of colors/greys, viewing size (in pixels), or compression. Video is subject to Editorial review and approval.

### **Appendices and Supplementary Material**

Authors who wish to publish electronic supplementary material to their article (Excel files, images, audio/video files) are requested to submit their manuscript via our online submission system, with a note in the author comments box that supplementary material will be submitted separately by email. This email, containing the supplementary material, should be sent to the Production Editor. In the email, the title of the submitted manuscript as well as the name of the corresponding author should be given.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)