

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TAYANE DE CÁSSIA DIAS MENDES SILVA

**Caracterização da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria palustris*
isolada de solo do Domínio Caatinga: otimização das condições de produção e
análise de atividades biológicas**

Recife, 2017

TAYANE DE CÁSSIA DIAS MENDES SILVA

**Caracterização da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria palustris*
isolada de solo do Domínio Caatinga: otimização das condições de produção e
análise de atividades biológicas**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Co-orientador: Dr. Esteban Espinosa Vidal

Recife, 2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Tayane de Cássia Dias Mendes

Caracterização da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria palustris* isolada de solo do Domínio Caatinga: otimização das condições de produção e análise de atividades biológicas / Tayane de Cássia Dias Mendes Silva- Recife: O Autor, 2017.

94 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientador: Esteban Espinosa Vidal

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Bactéria 2. Carotenóides 3. Caatinga I. Silva, Márcia Vanusa da (orientadora) II. Vidal, Esteban Espinosa (coorientador) III. Título

579

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-244

Caracterização da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria palustris* isolada de solo do Domínio Caatinga: otimização das condições de produção e análise de atividades biológicas

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biotecnologia.

Data de Aprovação: 10/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Orientadora/UFPE)

Prof^a. Dra. Brígida Thais Luckwu de Lucena (UEPB)

Prof^a. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima (UFPE)

“Dedico este trabalho aos meus pais Ana Lúcia e Paulo Mendes, ao meu irmão Paulo Vitor, que sempre acreditaram nos meus sonhos, me deram todo amor e suporte para chegar até aqui. Ao meu esposo Fábio Pereira que sempre caminhou junto comigo em todos os momentos dessa jornada.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pelo dom da vida, por todas as oportunidades que tem me dado, pela força e coragem para seguir em frente e nunca desistir dos meus sonhos. Por sua presença constante em minha vida!

Aos meus pais Ana Lúcia e Paulo Mendes, que sempre foram os primeiros “Orientadores” da minha vida. Obrigada por todo incentivo, dedicação e esforços feitos para contribuir com minha formação pessoal e profissional. Sou grata por acreditarem nos meus sonhos e fazerem deles os seus também. Vocês são a minha maior inspiração, o meu melhor exemplo, a minha base... Este trabalho é o nosso sonho concretizado!

Ao meu esposo Fábio Pereira, que desde o início do nosso relacionamento buscou compreender e participar de todas as situações e decisões da minha vida acadêmica. Obrigada pelo seu amor, pela força que me dá a cada dia, pela cumplicidade, companheirismo e por tudo que temos sonhado e conquistado juntos! Tudo ficou mais fácil caminhando junto com você...

Ao meu irmão Paulo Vitor, que assim como meus pais sempre esteve ao meu lado, contribuindo com sua amizade, compartilhando seus conhecimentos da área gráfica e sempre confiante de que tudo daria certo. Você é o melhor irmão que eu poderia ter!

A todos os meus familiares, em especial aos meus bisavôs Oscar e Lindalva (*in memoriam*) que desde a infância apoiaram meus estudos. As minhas avós Elza e Noêmia, meus tios, primos, sogros e cunhada, que estão sempre na torcida pelas minhas conquistas.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva, que desde a iniciação científica vem me acompanhando, contribuindo com seus conhecimentos e ideias inovadoras, acreditando no meu potencial e me ensinando a ser uma profissional melhor. Sou muito grata por sua confiança, por todos os recursos que nos proporciona, pelos momentos de conversa que nos enriquecem tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Obrigada por estar sempre disposta a aprender e fazer novas parcerias, que talvez sejam essas as melhores qualidades de um professor.

Ao meu co-orientador Dr. Esteban Espinosa Vidal, pelo seu acolhimento em seus laboratórios e estruturas do CETENE. Mas principalmente por acreditar em mim e no nosso projeto, por todos os seus conhecimentos compartilhados, por todo tempo que dedicou desenvolvendo alguns experimentos comigo. Por todo seu profissionalismo e ética, que são exemplos para mim. Também agradeço por suas correções e críticas que contribuíram imensamente com minha formação profissional.

À professora Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia, por todo apoio, colaboração científica e também por todos os recursos que nos disponibiliza para desenvolvimento dos projetos.

À professora colaboradora Prof^a. Dr^a. Brígida Lucena, que contribuiu disponibilizando a coleção de isolados bacterianos produtores de pigmentos para realização do projeto. Agradeço pelo auxílio com todos os seus conhecimentos na área de biologia molecular de microrganismos e em especial, na escrita científica.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Bioprocessos - CETENE Aldenise Lizandra e Isaac Martins que me acolheram com muito carinho. Sou muito grata por todo auxílio e suporte que me proporcionaram durante os experimentos, e em especial pelo vínculo de amizade que construímos.

A pesquisadora do Laboratório de Bioprocessos - CETENE Raquel Souza, por todo o aprendizado e as técnicas compartilhadas. Sou grata pelo seu imenso auxílio nas nossas fermentações realizadas no biorreator, pelo seu profissionalismo e responsabilidade.

À técnica do Laboratório de Fitoquímica e Processos – CETENE Joana Alves, por toda disponibilidade e suportes dados em meus experimentos. Ao pesquisador Kelvin Silva da Central Analítica - CETENE, por todo auxílio nas análises cromatográficas. Também agradeço à técnica Nataly Amorim da Central Analítica, que contribuiu com as análises espectrofotométricas de massas.

As minhas colegas pesquisadoras do Laboratório de Bioprocessos Fernanda, Flávia, Carol e Joselma, pela convivência de laboratório, por todos os auxílios, aprendizados e parcerias científicas.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular Sivoneide, Amanda, Lívia, Bruno, Hortência, Bárbara, Karine, Louise, Izabelly, Túlio, pelo convívio, por todas as trocas intelectuais e pelas colaborações científicas para a construção de trabalhos publicados em congressos.

A todos que fazem parte do Departamento de Bioquímica, em especial aos professores e aos colegas dos laboratórios de Engenharia Metabólica, de Produtos Naturais, de Biotecnologia e de Glicoproteínas, por colaborarem com o uso de suas estruturas e aparelhos.

A Prof^a. Dr^a. Gláucia Lima do Departamento de Antibióticos, que auxiliou com alguns conhecimentos de taxonomia e morfologia no início deste trabalho, esclarecendo algumas dúvidas e sempre se mostrando solícita.

Aos meus colegas da turma PGCB 2015.1, pelos momentos de aprendizado e de enriquecimento profissional compartilhados no decorrer do mestrado.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro.

Finalmente, agradeço a todos que ao seu modo contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho! Gratidão a todos!

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa...”

(Santa Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O grupo dos carotenoides é bastante utilizado como corantes naturais, para enriquecer alimentos e rações, mas também são usados devido suas funções biológicas, como suas propriedades antioxidantes e fotoprotetoras, que resultam no fortalecimento do sistema imunológico e na redução do risco de doenças degenerativas. A produção biotecnológica de carotenoides por microrganismos apresenta-se como uma alternativa viável. Várias bactérias são capazes de produzir pigmentos carotenoides, inclusive do gênero *Kocuria*. Na região da Caatinga brasileira apenas 1% das bactérias foi descrita, indicando a necessidade de ser explorada a biodiversidade, inclusive como uma fonte natural de carotenoides. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e otimizar a produção de carotenoide por dois isolados bacterianos (FT-7.22 e FT-5.12) da Caatinga, e analisar suas aplicações biológicas. Inicialmente, foi realizada a identificação molecular usando gene ribossomal 16S, em que os isolados foram identificados como *Kocuria palustris*. Em seguida, realizaram-se planejamentos fatoriais a fim de otimizar a produção de carotenoides, com ensaios em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio TSB (Tryptic Soy Broth), iniciando as cinéticas de crescimento com uma densidade óptica de concentração de células (OD, 600nm) de 0,1. Nesses ensaios foram avaliados os efeitos dos fatores luminosidade, temperatura de incubação, agitação, tipo de isolado bacteriano e estratégias para homogeneização do cultivo de células (presença ou ausência de espirais), sobre a produção total de carotenoides ($\mu\text{g/L}$) e produção específica ($\mu\text{g/g}$). Após obter o ensaio maximizado referente à produção de carotenoides em erlenmeyers, que ocorreu nas condições a 30°C, ambiente claro, 250 rpm e com a presença de espiral no interior dos frascos, buscou-se aumentar a escala de produção utilizando biorreator (10 L), determinando-se a cinética de produção de carotenoide e outros parâmetros durante 48h. Posteriormente, foi realizada a caracterização do pigmento extraído a partir da biomassa bacteriana, através das ferramentas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS). Foi encontrado o carotenoide majoritário sarcinaxantina (705 Da), com uma concentração de 112,48 mg/L produzida por *Kocuria palustris* FT-7.22 e 50.39 mg/L por *K. palustris* FT-5.12. Bem como os compostos minoritários, seus derivados sarcinaxantina diglicosilada (1029 Da) e monoglicosilada (887 Da), e o licopeno (536,87 Da). A análise como antioxidante mostrou taxas de inibição da oxidação do ácido linoleico de $80,6 \pm 0,21\%$ para o extrato de *K. palustris* FT-7.22. e $73 \pm 0,042\%$ para o extrato de carotenoide obtido de *K. palustris* FT-5.12. Para a aplicação como fotoprotetor o extrato obtido de *Kocuria palustris* FT-7.22 apresentou um FPS de 6.81 ± 0.64 e o extrato de *K. palustris* FT-5.12 mostrou um FPS de 4.65 ± 0.83 . Dessa forma, pode-se sugerir que *Kocuria palustris* FT-7.22 destacou-se na produção de carotenoide sarcinaxantina e apresentou melhores valores de atividades biológicas, podendo ser utilizado em futuros estudos de formulação de cosméticos e em indústrias desse setor.

Palavras-chaves: *Kocuria palustris*. Sarcinaxantina. Planejamento fatorial. Atividade antioxidante. Atividade fotoprotetora.

ABSTRACT

The carotenoid group is widely used as natural dyes to enrich foods and feeds, but they are also used because of their biological functions, such as their antioxidant and photoprotective properties, which result in strengthening the immune system and reducing the risk of degenerative diseases. The biotechnological production of carotenoids by microorganisms is a viable alternative. Several bacteria are capable of producing carotenoid pigments, including the genus *Kocuria*. In the Brazilian Caatinga region, only 1% of the bacteria were described, indicating the need to exploit biodiversity, including as a natural source of carotenoids. Thus, the objective of this work was to characterize and optimize carotenoid production by two bacterial isolates (FT-7.22 and FT-5.12) from Caatinga, and to analyze their biological applications. Initially, molecular identification was performed using 16S ribosomal gene, in which the isolates were identified as *Kocuria palustris*. Factorial schedules were then performed to optimize carotenoid production with 250 ml Erlenmeyer assays containing 50 ml TSB medium (Tryptic Soy Broth), initiating growth kinetics with an optical density of cell concentration (OD, 600nm) of 0.1. In these tests the effects of the factors of luminosity, incubation temperature, agitation, bacterial isolate type and strategies for cell culture homogenization (presence or absence of spirals), on the total carotenoid production ($\mu\text{g/L}$) and specific production ($\mu\text{g/g}$). After obtaining the maximized assay for the production of carotenoids in erlenmeyers, which occurred under the conditions at 30°C, light environment, 250 rpm and with the presence of a spiral inside the bottles, the scale of production was investigated using bioreactor (10L), determining the kinetics of carotenoid production and other parameters during 48h. Subsequently, the characterization of the pigment extracted from the bacterial biomass was performed using the High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) and Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS). Was found the major carotenoid sarcinaxanthin (705 Da) at a concentration of 112.48 mg/L produced by *Kocuria palustris* FT-7.22 and 50.39 mg/L by *K. palustris* FT-5.12. As well as the minor compounds, their derivatives diglycosylated (1029 Da) and monoglycosylated sarcinaxanthin (887 Da), and lycopene (536.87 Da). Antioxidant analysis showed rates of inhibition of linoleic acid oxidation of $80.6 \pm 0.21\%$ for *K. palustris* FT-7.22 extract and $73 \pm 0.042\%$ for the carotenoid extract obtained from *K. palustris* FT-5.12. For the application as photoprotector, the extract obtained from *Kocuria palustris* FT-7.22 presented a FPS of 6.81 ± 0.64 and *K. palustris* extract FT-5.12 showed an SPF of 4.65 ± 0.83 . Thus, it can be suggested that *Kocuria palustris* FT-7.22 was highlighted in the production of carotenoid sarcinaxanthin and presented better values of biological activities, being able to be used in future studies of cosmetic formulation and in industries of this sector.

Keywords: *Kocuria palustris*. Sarcinaxanthin. Factorial design. Antioxidant activity. Photoprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Estrutura química do carotenoide sarcinaxantina.....	24
Figura 2: Biossínteses de isoprenoides através da via ácido mevalônico (MVA) e a via fosfato metileritritol (MEP).....	25
Figura 3: Via biossintética de carotenoides simplificada a partir de licopeno, do δ -caroteno e γ -caroteno.....	26
Figura 4: Via biossintética de sarcinaxantina e seus glicosídeos. CrtEBI, GGPP sintase, fitoenosintetase, e fitoenodesaturase; CrtE2, licopeno elongase; CrtYg + CrtYf, carotenoide C ₅₀ γ -ciclase; CrtX, carotenoide C ₅₀ glicosiltransferase.....	27
Figura 5: Propriedades físicas, químicas e biológicas dos carotenoides.....	30
Figura 6: Estrutura do β -caroteno (a) e do ácido linoleico (b).....	33
Figura 7: Localização do Domínio Caatinga na região Nordeste do Brasil.....	42
Figura 8: Aspecto geral da vegetação predominante da Caatinga.....	43

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figure 1: First factorial design 2^3 with the effect of factors luminosity (L), temperature (T) and bacterial isolated type in the carotenoid production. (a) Pareto diagram with the effects in these variables on total carotenoids production ($\mu\text{g/L}$). (b) Pareto diagram with the effects on specific production carotenoids ($\mu\text{g/g}$). (c) Response surface of influence of luminosity and bacterial isolated type on total carotenoid production in the factorial design 2^362

Figure 2: Second factorial design 2^3 with the effect of agitation (A), strategy for cell culture homogenization (S) of and bacterial isolated type (Kpa) in the carotenoid production. (a) Pareto diagram with the effects these variables on total carotenoids production ($\mu\text{g/L}$). (b) Pareto diagram with the effects on specific production carotenoids ($\mu\text{g/g}$). (c) Pareto diagram with the effects on biomass (g/L). (d) Response surface of effect of agitation and strategy for cell culture homogenization on total carotenoid production. (e) Response surface of effect of agitation and bacterial isolated type in the dry weight biomass production.....65-66

Figure 3: Kinetic of production total and specific of carotenoids in bioreactor by *Kocuria palustris* at optimized conditions (250 rpm, 30°C , light environment. 1.0 vvm, initial pH 7.0 in medium TSB) (a) Isolated FT-5.12 (b) Isolated FT-7.22.....67-68

Figure 4: (a) HPLC elution profiles of the carotenoids extracted from *Kocuria palustris*. (b) Absorption spectra of majority carotenoid from *Kocuria palustris* identified using spectral data....70

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Dados de absorção de Uv/Visível de carotenoides comuns.....28

Tabela 2: Microrganismos produtores de carotenoides.....36

Tabela 3: Pigmentos naturais produzidos por bactérias e suas aplicações.....38

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1: Independent variable levels used in the factorial design.....	58
Table 2: First factorial design 2^3 with coded values and experimental responses obtained after 48 hours of production <i>Kocuria palustris</i> for total carotenoid, specific carotenoid and dry weight biomass.....	61
Table 3: Second factorial design 2^3 with values and experimental results obtained from production of <i>Kocuria palustris</i> varying the oxygen transfers rate (agitation and absence and presence of spirals in the flask).....	64
Table 4: Parameters calculated during the carotenoid production in bioreactor in TSB medium to the point maximized under the conditions: 250 rpm, 30°C in light environment, aeration 1.0 vvm initial pH 7.0, 48 h bioproduction.....	69

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA: análise de variância

ATCC: American Type Culture Collection

C₄₀H₅₆: Fórmula molecular de carotenoides de 40 carbonos

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

K₂HPO₄: Fosfato (mono)ácido de potássio

NaCl: Cloreto de sódio

OD: Densidade óptica

O₂(¹Δ_g): Oxigênio singleto

PABA: Ácido p-Aminobenzoico

PCR: Reações em Cadeia de Polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

PTFE: Politetrafluoretileno

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: Rotações por minuto

RT: Tempo de retenção

TSB: Caldo Soja Trypticaseína

UEPB: Universidade Estadual da Paraíba

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra-desempenho

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta Visível

vvm: Volume de ar por volume de efluente por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1	CAROTENOIDES.....	22
3.1.1	Estrutura e classificação.....	23
3.1.2	Carotenoide sarcinaxantina.....	24
3.1.3	Via biossintética dos carotenoides.....	25
3.1.4	Propriedades, funções e aplicações de carotenoides.....	27
3.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS CAROTENOIDES.....	31
3.2.1	Antioxidantes.....	31
3.2.1.1	Método de avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	32
3.2.2	Fotoproteção.....	33
3.2.2.1	Método <i>in vitro</i> para avaliação do fotoprotetor.....	34
3.3	PRODUÇÃO MICROBIANA DE CAROTENOIDES.....	35
3.3.1	Bactérias produtoras de carotenoides.....	37
3.3.2	Fatores que influenciam a produção bacteriana de carotenoides.....	39
3.3.3	Estratégias de otimização da síntese de carotenoides.....	40
3.4	BACTÉRIA <i>Kocuria palustris</i>	41
3.5	DOMÍNIO CAATINGA.....	42

4 REFERÊNCIAS.....	45
ARTIGO - Optimization of the carotenoid production by <i>Kocuria palustris</i> from Brazilian Caatinga region and analysis of biological activities.....	55
Introduction.....	56
Materials and methods.....	57
Bacterial identification.	57
Kinetic Tests	58
Optimization of carotenoid production by experimental design.....	58
Pigment production on a large scale.....	59
Parameters for conversion calculations.....	59
Analytical procedures.....	59
Biological activities.....	60
Antioxidant Activity.....	60
Photoprotective activity in vitro.....	60
Results and discussion	61
16S rDNA sequence analysis	61
Effect of temperature incubation, luminosity and bacterial <i>Kocuria palustris</i> FT-5.12 and FT-7.22 in carotenoid production	61
Effect of gas transfer rate and bacterial <i>Kocuria palustris</i> FT-5.12 and FT-7.22 in arotenoid production.....	64
Pigment production on a large scale.....	67
Identification of carotenoids.....	69
Biological activities.....	71

Antioxidant Activity.....	71
Photoprotective activity <i>in vitro</i>	72
Conclusion.....	72
Acknowledgements.....	72
References.....	72
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	77
ANEXO I - Normas da revista: Bioprocess and Biosystems Engineering.....	80
ANEXO II - Comprovação da submissão do artigo.....	95

1 INTRODUÇÃO

Nos diversos segmentos industriais alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e têxteis, são utilizados pigmentos para conferir coloração, para restituir a aparência original a qual pode ter sido afetada por várias etapas do processamento de estocagem, de embalagem ou de distribuição. Os corantes também são amplamente empregados para tornar os alimentos visualmente mais atraentes, auxiliando também na identificação de aromas geralmente associados a determinados produtos (ARIMBOOR et al., 2015; HAILEI et al., 2011; MAPARI et al., 2005).

Entre os corantes empregados na indústria, os de origem natural têm ganhado destaque sobre os sintéticos, apresentando esses últimas toxicidades variáveis, seja pela toxicidade dos precursores ou produtos, ou pela eliminação incorreta destes no ecossistema. Entre os efeitos adversos podem causar urticárias, alergias, ter ação mutagênica e/ou carcinogênica (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013). Dessa forma, os corantes sintéticos dos diversos produtos vêm sendo criticados e evitados pelos consumidores.

Neste sentido, a procura por corantes naturais está aumentando dia a dia devido as vantagens no uso, como estabilidade, segurança, somado às propriedades biológicas benéficas ao corpo humano; além de ser um recurso ecologicamente amigável e biodegradável. Devido ao exposto, os pigmentos naturais apresentam um incremento na atratividade do produto, estimulando a exploração de novas fontes naturais de corantes e suas aplicações (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

Os carotenoides fazem parte do grupo de corantes naturais, sendo responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho de muitos produtos (ARULSELVI et al., 2014). Plantas, algas e microrganismos possuem capacidade de produção com diferentes rendimentos. Além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade antioxidante, pró-vitâmica A, atividade fotoprotetora e suas propriedades que resultam em possíveis funções benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (KIRTI et al., 2014; MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2012). Por essas características, a demanda por carotenoides aumenta 2,9 % ao ano no mercado global, resultando no desenvolvimento de processos para obtenção de carotenoides naturais e estáveis (CHENG; YANG, 2016).

Já foram descritos mais de 600 tipos de carotenoides, dos quais mais de 95% possuem 40 carbonos na sua estrutura, enquanto um pequeno número é formado por 30 carbonos e um número bem menor é formado por 50 carbonos, considerado como carotenoides raros. Esse último grupo apresenta várias ligações duplas conjugadas com pelo menos, um grupo hidroxilo, que contribuem para importantes propriedades fotoprotetoras e antioxidantes (HEIDER et al., 2014; NETZER et

al., 2010), porém já que são pouco encontrados na natureza, poucos estudos são conduzidos com esses carotenoides C50. Dessa forma, faz-se interessante a procura de conhecimentos relacionados com esse grupo raro de carotenoides C50, que apresentam atrativas propriedades.

A produção de carotenoides por via microbiana apresenta uma estratégia viável, com capacidade para obter carotenoides de forma rápida e eficiente (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012). Essa produção é independente de fatores externos e abastecimento sazonal de matérias-primas, permitindo gerar uma vasta quantidade de pigmento de forma uniforme, e apresentando uma ampla faixa de coloração (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012). Assim, a produção e aplicação de pigmentos bacterianos como corantes naturais, principalmente na classe dos carotenoides, é hoje um dos campos emergentes de investigação. A bioprospecção de bactérias desconhecidas para produção de carotenoides vem se destacando como foco de pesquisas da área biotecnológica (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

A fim de gerar um maior rendimento de carotenoides e contribuir para a redução de custos por meio da via biotecnológica, são realizados estudos de otimização da produção de carotenoides, que se trata de uma das mais importantes estratégias para atingir uma produção de alto nível. As concentrações de carotenoides produzidas podem ser alteradas através de planejamentos fatoriais que avaliem a influência de fatores como componentes do meio, tipo de estirpe, temperatura, pH, luz, arejamento, agitação, entre outros (MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2012; UBEDA, 2008).

No domínio da Caatinga as atividades de pesquisas em diversidade microbiana e, conseqüentemente, a exploração tecnológica dos recursos microbianos, ainda são bastante limitadas e inexpressíveis. Entre os microrganismos, apenas 1% de todas as bactérias (compreendendo as pigmentadas e não pigmentadas) já foram descobertas e descritas, indicando uma vasta biodiversidade a ser explorada, inclusive como fonte natural de novos carotenoides (MARTIN et al., 2003). Os microrganismos que se desenvolvem nesses ambientes hostis ou extremos são denominados extremófilos (CANGANELLA; WIEGEL, 2011), reconhecidos como potenciais produtores de moléculas naturais de interesse biotecnológico.

Neste contexto, este estudo apresenta a primeira caracterização e otimização da produção de um carotenoide raro com 50 carbonos em sua cadeia, denominado sarcinaxantina, sintetizado por dois isolados bacterianos do domínio Caatinga. Também foi testado o potencial antioxidante e protetor solar desses extratos de carotenoides, de modo que esses pigmentos naturais podem ser futuramente aplicados em formulações cosméticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar e otimizar a produção de carotenoides por bactérias isoladas do Domínio Caatinga, e avaliar as atividades biológicas desses pigmentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados bacterianos através do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S;
- Caracterizar a produção de carotenoides por bactérias isoladas de solo da Caatinga;
- Determinar as condições para otimização da produção de carotenoides, através de planejamentos fatoriais;
- Aumentar a escala de produção de carotenoides, utilizando biorreatores;
- Avaliar os parâmetros fermentativos, cinéticos e de fatores de conversão;
- Realizar a extração e caracterização dos pigmentos;
- Analisar a aplicação dos carotenoides como antioxidantes e fotoprotetores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CAROTENOIDES

Os carotenoides são uma das classes de pigmentos naturais frequentemente encontrados em plantas, algas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BANZATTO; FREITA; MUTTON, 2013). Esses pigmentos responsáveis pelas cores amarelo brilhante, laranja e vermelho, formam um dos mais importantes grupos de corantes naturais devido a sua ampla distribuição (ARULSELVI et al., 2014), diversidade nas estruturas e funções. São bastante utilizados como corantes e no enriquecimento de alimentos e rações, porém mais recentemente vêm despertando o interesse de outros setores industriais como farmacêutico, médico, cosmético e nutracêuticos. Principalmente por apresentar importantes funções biológicas benéficas à saúde humana: como a diminuição do risco de doenças degenerativas e no auxílio do fortalecimento do sistema imunológico (KISER; GOLCZAK; PALCZEWSKI, 2013; ZHAI et al., 2014).

Alguns carotenoides são precursores da vitamina A, outros apresentam propriedades fotoprotetoras e antioxidantes, que diminuem os riscos de contrair doenças em que a presença de radicais livres é o comum denominador. Tais doenças são os diferentes tipos de câncer, esclerose múltipla, arteriosclerose, doenças cardiovasculares, Alzheimer, degeneração macular e catarata, entre algumas (ARMSTRONG; HEARST, 1996; HEIDER et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que o consumo de produtos ricos em carotenoides, como o carotenoide licopeno tem sido associado à proteção contra certos tipos de câncer, principalmente o câncer de próstata (GIOVANNUCCI, 2002). De acordo com Stahl; Sies (2005), pesquisas observaram os efeitos inibitórios no crescimento de células de leucemia quando o licopeno foi combinado com 1,25-di-hidroxi-vitamina D3, ou quando combinado com tocoferol inibiu o crescimento de linhas celulares de carcinoma de próstata humana.

Os principais carotenoides provitamínicos A presentes nas dietas ocidentais são o β -caroteno, α -caroteno e β -criptoxantina que têm demonstrado prevenir a deficiência de vitamina A, que é essencial para a promoção do crescimento, desenvolvimento e função visual (STAHL; SIES, 2005). A ingestão da β -criptoxantina encontrada em altos níveis no gênero *Citrus* pode auxiliar contra o risco de câncer de pulmão, bem como ingestão de luteína e zeaxantina, por exemplo, podem proteger o olho contra degeneração macular (MÄNNISTÖ et al., 2004). A suplementação alimentar com β -caroteno, luteína e licopeno também mostram resultados positivos na proteção contra eritemas induzidos por radiação UV (HEINRICH et al., 2003).

Devido à variabilidade de aplicação dos compostos carotenoides e consequentemente, do grande interesse na exploração desses pigmentos, desde o século XIX as pesquisas mantiveram-se

em constante desenvolvimento com o objetivo de buscar novas fontes e técnicas para aumentar a produção dos carotenoides. Atualmente, aproximadamente 600 diferentes tipos de carotenoides já foram descobertos e caracterizados estruturalmente (RAMACHANDRAN; IQBAL; AMIRUL, 2014). Segundo Cutzu et al. (2015), o valor total dos carotenoides no mercado global tem um crescimento anual de 2,3% e espera-se que em 2018 possa chegar a US \$ 1,4 bilhões, impulsionado pela demanda de aplicações e o crescente interesse em desenvolver processos destinados a produzir eficientemente esses pigmentos.

3.1.1 Estrutura e classificação

Originados da via biossintética dos terpenoides, a estrutura básica dos carotenoides apresenta oito unidades isoprenoides unidas de maneira que a molécula apresente simetria invertida no centro. Desta forma, os dois grupos metílicos centrais ocupam as posições 1,6 e os outros grupos metílicos restantes permanecem presentes nas posições 1,5 (PFANDER, 1992; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; ÚBEDA, 2008; VETTER et al., 1971)

Apresentam estruturas lineares, simétricas e que em geral é derivada de uma cadeia acíclica $C_{40}H_{56}$ que contém um sistema de duplas e simples ligações distribuídas ao longo de sua extensão. Esse sistema é uma das características mais marcantes da estrutura dos carotenoides, já que é responsável pelas propriedades pigmentares dos mesmos. A intensidade das cores dessas moléculas é determinada pela extensão do sistema de duplas ligações conjugadas e a presença ou ausência das funções (BRITTON, 1995; KIRTI et al., 2014).

A maioria dos carotenoides naturais possui 40 carbonos, conhecidos como tetraterpenoides, que são sintetizados a partir da via do fitoeno (C_{40}) e são produzidos por plantas superiores, algas, fungos e bactérias. Existe apenas um pequeno número de carotenoides que apresenta 30 carbonos (C_{30}) e um grupo menor ainda de carotenoides com 50 átomos de carbonos (C_{50}), sintetizados por bactérias (HEIDER et al., 2014).

A diversidade dos pigmentos carotenoides se origina a partir de modificações das cadeias da estrutura principal do licopeno, do δ -caroteno e do γ -caroteno (Figura 3) (GOODWIN, 1993; ÚBEDA, 2008). Essas modificações podem ser resultados de reações de: hidrogenação, desidrogenação, ciclização (que dá origem a sete grupos finais diferentes - Ψ , β , ε , γ , κ , Φ e χ), oxidação, isomerização, entre outras. Também, é freqüente observar migrações da dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjos, introdução de funções oxigenadas e/ou a combinação destas, desde que os grupos metílicos centrais sejam mantidos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). De acordo com a presença ou ausência de anéis, os carotenoides podem ser

acíclicos (licopeno), monocíclico (γ -caroteno) ou bicíclico (β -caroteno) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Considerando isso, os carotenoides são classificados de acordo com características das estruturas moleculares conforme a ausência ou presença de átomos de oxigênio em dois grandes grupos: os carotenos e as xantofilas (AMORIM-CARRILHO et al., 2014). Os carotenos são compostos por átomos de carbono e hidrogênio, a exemplo do beta-caroteno, licopeno, α -caroteno, entre outros. As xantofilas além de possuírem átomos de carbono e hidrogênio apresentam oxigênio na sua estrutura, sendo conhecidas como derivados oxigenados dos carotenos. Entre as principais funções orgânicas encontra-se as hidróxi (OH), carbóxi (CO_2H), carbometóxi (CO_2Me), metóxi (OMe), aldeído (CAROCHO ; FERREIRA, 2013), ceto (C=O) e epóxi (5,6-ou 5,8-epóxidos) (ARMSTRONG; HEARST, 1996; PFANDER, 1992). Exemplos de xantofilas são a zeaxantina, cantaxantina, espiriloxantina, torularodina, violaxantina, sarcinaxantina, etc. (MATA-GÓMEZ et al., 2014; RIVERA; CANELA-GARAYOA, 2012).

3.1.2 Carotenoide sarcinaxantina

Os carotenoides C50 são sintetizados unicamente por bactérias da ordem *Actinomycetales* (ARMSTRONG; HEARST, 1996) e por bactérias Gram-negativas *Pseudomonas* (MIKI et al., 1994).

Os carotenoides C50 conhecidos são a decaprenoxantina, a sarprenoxantina e a sarcinaxantina (Figura 1). Esse grupo raro de carotenoides (C50) possuem várias ligações duplas conjugadas e contém pelo menos um grupo hidroxilo, ambas as características contribuem para fortes propriedades antioxidantes (NETZER et al., 2010). Devido ao número de ligações duplas conjugadas que desloca a absorção de luz, filtrando luz UV e visível, esse grupo também apresenta propriedades fotoprotetoras (HEIDER et al., 2014).

Sarcinaxantina

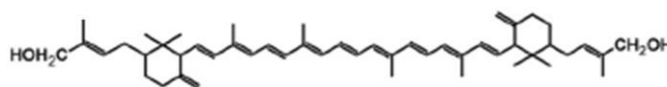


Figura 1: Estrutura química do carotenoide sarcinaxantina. Fonte: Adaptada de Netzer et al. (2010).

Alguns trabalhos mostram a produção do carotenoide C50 sarcinaxantina por bactérias, como o estudo de (KAISER et al., 2007) que entre outros resultados, sugere que *Micrococcus luteus* produz sarcinaxantina; Netzer et al. (2010) descreve a via biossintética da produção de sarcinaxantina por *Micrococcus luteus*; Heider et al. (2014) mostrou que o carotenoide sarcinaxantina também é

produzido por *Corynebacterium glutamicum*, através de seu estudo de investigação da via biossintética de produção de carotenoides por engenharia genética; Schmidt (2016) também sugeriu a produção de sarcinaxantina por *Micrococcus luteus*, em seu estudo de avaliação da produção de corantes naturais em bactérias isoladas do Semiárido brasileiro.

3.1.3 Via biossintética dos carotenoides

O isopentenildifosfato (KAISER et al., 2007) e seu isômero dimetilail difosfato (DMAPP), são as unidades básicas que a partir de cinco carbonos formam os terpenoides, que são os precursores dos carotenoides (KISER et al., 2013; ZHAI et al., 2014). Existem duas vias principais independentes para formação do IPP: a via do ácido mevalônico (MVA) e a via do metileritritolfosfato (MEP). A via MVA é encontrada em eucariotos (mamíferos, fungos e no citoplasma das células vegetais), no domínio *Archaea* e em um número limitado de bactérias. A maioria das eubactérias, bem como plastídios de plantas, sintetizam IPP através da via MEP (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN; BORONAT, 2015).

A diferença entre as vias biossintéticas do MVA e do MEP, é que na primeira o acetil-coenzima A (acetil-CoA) é convertido a IPP, já na segunda via, quem sintetiza o IPP é o piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (HEIDER et al., 2014; MARTIN et al., 2003) (Figura 2). Com a formação desse composto IPP que é posteriormente isomerizado a DMAPP, ocorrem reações em cadeia de alongação produzindo os precursores de carotenoides.

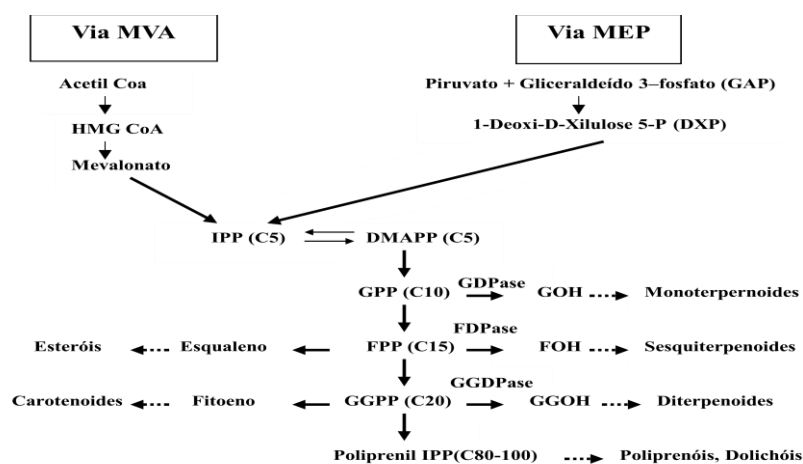


Figura 2: Biossínteses de isoprenoides através da via ácido mevalônico (MVA) e a via fosfato metileritritol (MEP). Fonte: Adaptada de Muraguchi et al. (2011).

O DMAPP se condensa com outra molécula IPP formando o Geranil Pirofosfato (GPP) com 10 carbonos. Por sua vez, essa molécula de 10 carbonos sofre condensação com uma molécula IPP formando Farnesil Pirofosfato (FPP) com 15 carbonos e em seguida, esse FPP se condensa com IPP

resultando em uma unidade de 20 carbonos, o Geranyl Geranyl Pirofosfato (GGPP). Duas moléculas C20 (GGPP) se unem para formar o fitoeno, que é um tetraterpenoide C40 e não apresenta cor.

O fitoeno sofre uma série de reações de desaturação e isomerização subsequentes que originam o neurosporeno ou licopeno e a partir destes, novas vias formarão os carotenoides acíclicos e cíclicos (SCHMIDT-DANNERT, 2000), como pode ser observado na figura 3.

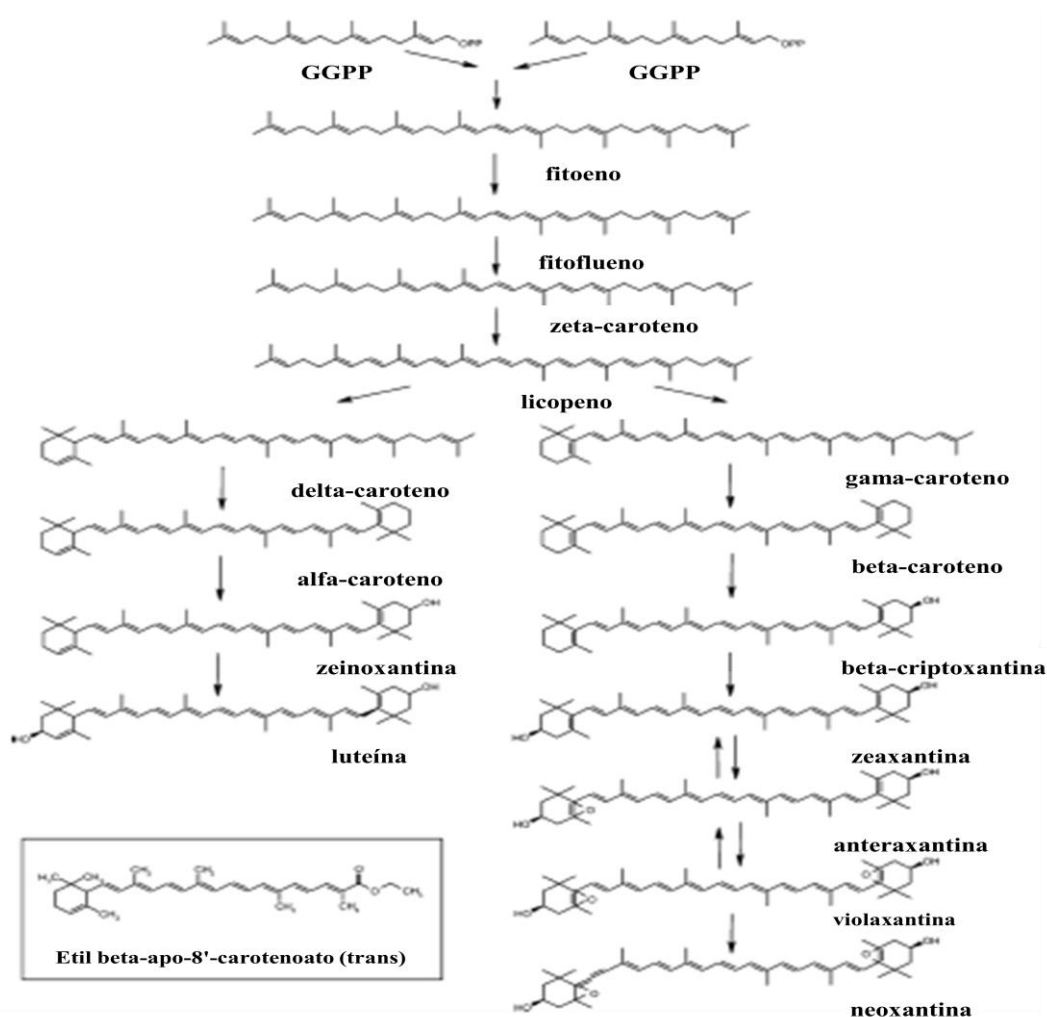


Figura 3: Via biossintética de carotenoides simplificada a partir de licopeno, do δ -caroteno e γ -caroteno. Fonte: Adaptada de Lefsrud et al. (2006).

Os carotenoides C50 também apresentam o licopeno como precursor (NETZER et al., 2010), sendo sintetizado pela via MEP nas bactérias da ordem *Actinomycetales*. A partir do licopeno, é formada a nonaflavuxantina e flavuxantina, catalisadas pela elongase licopeno crtE2, que por sua vez forma sarcinaxantina (Figura 4). Segundo Netzer et al. (2010) em um estudo com *Micrococcus luteus*, foram encontrados polipeptídios dos genes crtYg e crtYh com a função de catalisar a ciclização do carotenoide linear C50 flavuxantina para sarcinaxantina bicíclica, sendo essa reação de ciclização independente do anterior alongamento gradual do licopeno.

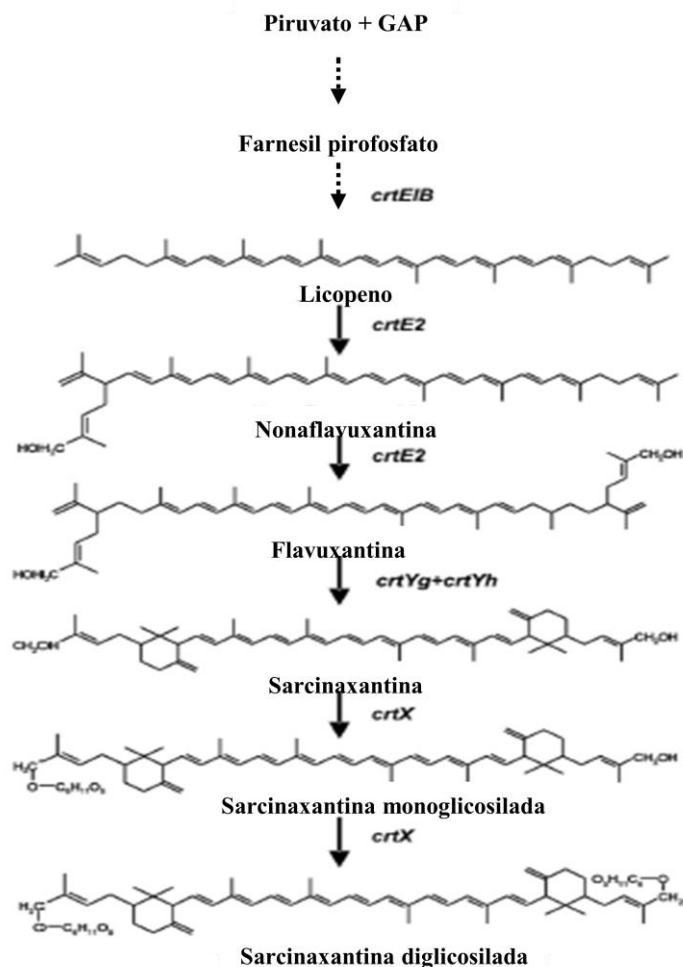


Figura 4: Via biossintética de sarcinaxantina e seus glicosídeos. CrtEBI, GGPP sintase, fitoenosintetase, e fitoenodesaturase; CrtE2, licopeno elongase; CrtYg + CrtYf, carotenoide C₅₀ γ -ciclase; CrtX, carotenoide C₅₀ glicosiltransferase. Fonte: Adaptada de Netzer et al. (2010).

3.1.4 Propriedades, funções e aplicações dos carotenoides

As diferentes propriedades físico-químicas e funcionalidades dos carotenoides são resultado da sua estrutura molecular (tamanho, forma, presença de grupos funcionais e polaridade) em conjunto com o sistema de duplas ligações (BRITTON, 1995; KRINSKY, 1994).

Devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo ocorre a absorção de luz desses pigmentos, especificamente na região ultravioleta (UV) e visível do espectro, o restante é transmitido ou refletido, sendo necessário, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenoide apresente coloração (GROSS, 2012). Os comprimentos de absorção máxima ($\lambda_{\max}$) e a forma do espectro de absorção UV/visível (estrutura fina espectral) são características do cromóforo, as quais são utilizadas na identificação de carotenoides, pois cada carotenoide é caracterizado por um espectro de absorção eletrônica (BRITTON, 1995; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). Dessa forma, a espectroscopia de absorção é uma

importante técnica na análise de carotenoides. Os valores de $\lambda_{\max}$ de alguns carotenoides estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados de absorção de Uv/Visível de carotenoides comuns.

Carotenoide	Solvente	$\lambda_{\max}$ (HAILEI et al.)
α -Caroteno	Acetona	424 448 476
	Clorofórmio	433 457 484
	Etanol	423 444 473
	Hexano, éter de petróleo	422 445 473
β -Caroteno	Acetona	(429) 452 478
	Clorofórmio	(435) 461 485
	Etanol	(425) 450 478
	Hexano, éter de petróleo	(425) 450 477
α -Cryptoxantina/Zeinoxantina	Clorofórmio	435 459 487
	Etanol	423 446 473
	Hexano	421 445 475
β –Cryptoxantina	Clorofórmio	(435) 459 485
	Etanol	(428) 450 478
	Éter de petróleo	(425) 449 476
Luteína	Clorofórmio	435 458 485
	Etanol	422 445 474
	Éter de petróleo	421 445 474
Licopeno	Acetona	448 474 505
	Clorofórmio	458 484 518
	Etanol	446 472 503
	Éter de petróleo	444 470 502
Zeaxantina	Acetona	(430) 452 479
	Clorofórmio	(433) 462 493
	Etanol	(428) 450 478
	Éter de petróleo	(424) 449 476

Fonte: Adaptada de Rodriguez-Amaya, D. B; Kimura (2004).

Ao mesmo tempo, o sistema de ligação dupla conjugado proporciona o potencial das moléculas de carotenoides de atuarem como antioxidantes, que são avaliados por reações de

carotenoides com agentes oxidantes, e radicais peroxi (GRUSZECKI; STRZAŁKA, 2005; KIRTI et al., 2014). Neste sentido, entre as principais propriedades destacam-se a absorção da luz, a capacidade de desativação do oxigênio singleto, bloqueio de radicais livres, hidrofobicidade, facilidade de isomerização e oxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Em termos de hidrofobicidade, os carotenoides são uma classe de moléculas lipossolúveis associadas a frações lipídicas, com pouca ou nenhuma solubilidade em água (WISNIEWSKA; SUBCZYNSKI, 1998). A polaridade dos carotenoides pode ser alterada por grupos funcionais polares e também pela interação de carotenoides com outras moléculas. Os carotenos são apolares e as xantofilas são mais polares, porém ainda insolúveis em água. Dessa forma, os carotenos são solúveis em solventes apolares como éter de petróleo, hexano, tolueno, por sua vez as xantofilas são mais bem solubilizadas em solventes polares como o metanol e etanol (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Os carotenoides apresentam propriedades de quiralidade, formando isômeros assimétricos. As formas de isômeros (*cis* e *trans*) determinam a forma da molécula carotenoide e podem assim alterar as suas propriedades, afetando a solubilidade e a absorvibilidade. A forma *trans* é mais estável na natureza que a forma *cis*, sendo caracterizada por ser mais rígida e tem uma maior tendência para cristalizar ou agregar que as formas *cis* (KIRTI et al., 2014). De acordo com (OLSON; KRINSKY, 1995), a maioria dos carotenoides possuem 9-13 ligações duplas conjugadas e cada uma é capaz de formar muitas formas geométricas de isômeros. Por exemplo, o β -caroteno tem nove ligações duplas em sua cadeia de polieno que pode formar diferentes configurações *cis/trans*, podendo formar teoricamente 272 isômeros, enquanto seu isômero assimétrico, α -caroteno, é capaz de formar 512 isômeros.

Devido a essa alta taxa de insaturação, esses pigmentos apresentam alta reatividade química, sendo sensíveis ao calor, a luz e a ácidos (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004), podendo ser facilmente isomerizados da forma *trans* para a forma *cis*, promovendo quebra de cadeia, ligeira perda de cor e de atividade pró-vitamínica. Também são suscetíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem da estrutura do carotenoide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, pro-oxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz, que levam a alterações ou parcial destruição dos pigmentos (HEIDER et al., 2014).

Além de atuarem como corantes nos diversos processos de produção de alimentos e promover seus enriquecimentos, os carotenoides também são precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos e fragrâncias de algumas flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS; JIMÉNEZ; SANCHEZ, 2000).

Esse grupo de corantes naturais também apresentam atividades biológicas importantes destacando-se a atividade pró-vitamínica A de alguns carotenoides (β -caroteno, γ -caroteno, α -

caroteno, β -criptoxantina e a α -criptoxantina) (BAUERNFEIND; ADAMS; MARUSICH, 1981; RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Pesquisas relatam a atividade biológica de carotenoides e/ou seus metabólitos com impactos na sinalização celular, já que influenciam na expressão de certos genes ou pode atuar como inibidores de enzimas que têm sido discutidos no contexto de prevenção ao câncer (STAHL; SIES, 2005).

Por estarem associados à atividade antioxidante, os carotenoides estão relacionados com a inibição de doenças causadas pela presença de radicais livres como: arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares (AKSU; EREN, 2007; BHOSALE, 2004; MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007). Alguns carotenoides também atuam como fotoprotetores protegendo as células contra os danos da reação da luz com oxigênio e realizando filtragem de luz excessiva (MARASCO; SCHMIDT-DANNERT, 2003). O β -caroteno, por exemplo, proporciona um tratamento eficaz para pacientes portadores de protoporfiria eritropoiética, que apresenta como principal sintoma hipersensibilidade da pele à exposição solar (KIRTI et al., 2014). Na figura 5 pode-se observar um resumo de algumas propriedades químicas, físicas e biológicas dos carotenoides.

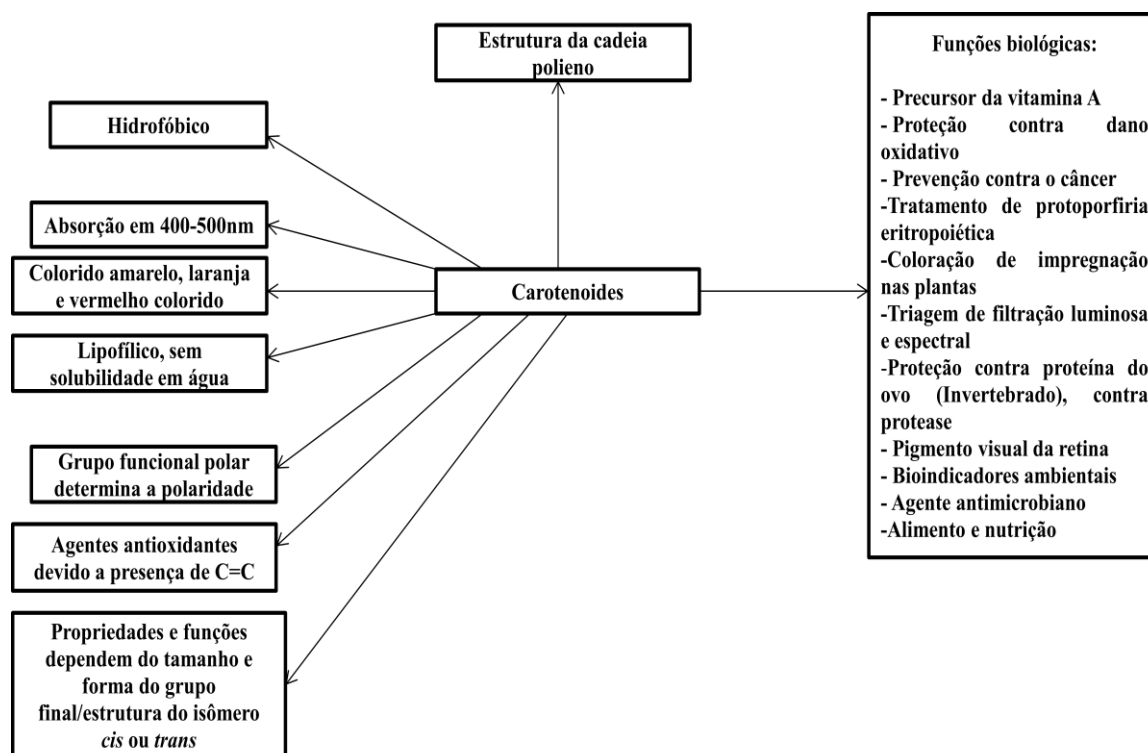


Figura 5: Propriedades físicas, químicas e biológicas dos carotenoides. Fonte: Adaptada de Kirti et al. (2014).

A maioria das pesquisas referentes aos carotenoides e seus potenciais, abordam os carotenoides C40 mais abundantes como o licopeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina, β -

criptoxantina, a α -criptoxantina, entre outros já citados, bastante descritos na literatura e com diferentes atividades biológicas. Porém, poucos estudos existem relacionados com os carotenoides que apresentam 50 carbonos em suas cadeias. Esses carotenoides C50 possuem várias ligações duplas conjugadas, que apresentam pelo menos um grupo hidroxilo, as quais contribuem para fortes propriedades antioxidantes e fotoprotetoras (NETZER et al., 2010). Isso apresenta um interesse econômico, estimulando o desenvolvimento de estudos para futuras aplicações em protetores solares e cosméticos, com produção em alta escala (MATA-GÓMEZ et al., 2014)

3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS CAROTENOIDES

3.2.1 Antioxidantes

Os danos oxidativos dos sistemas biológicos são causados por radicais livres, que são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados altamente instáveis e reativos com outras moléculas. Eles formam espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (BHOSALE; BERNSTEIN, 2004). As principais EROs incluem os radicais ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$), radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) e as não-radicalares peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl). Entre as ERNs estão os derivados da reação do óxido nítrico (NO) com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), também estão óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) (CAROCHO; FERREIRA, 2013; LÜ et al., 2010; SEIFRIED et al., 2007).

Essas espécies reativas são produzidas pelos organismos vivos como resultado do metabolismo celular normal e de fatores ambientais, como a poluição atmosférica ou fumaça de cigarro, entre outros. Elas podem danificar estruturas das células, tais como carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, alterando as suas funções (BIRBEN et al., 2012).

A substância capaz de prevenir, retardar ou eliminar os danos oxidativos para uma molécula alvo é conhecida como antioxidante (FLORA, 2009). A ação do antioxidante pode ser de forma direta através da reação com radicais livres ou indireta através da inibição da atividade/expressão de enzimas geradoras de radicais livres, ou intensificando a atividade/expressão de enzimas antioxidantes intracelulares. As enzimas antioxidantes intracelulares e a ingestão de antioxidantes na dieta podem ajudar a manter uma adequada capacidade antioxidante no organismo (LÜ et al., 2010).

Quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a defesa antioxidante, caracterizado pela inabilidade dos antioxidantes endógenos de neutralizar o dano oxidativo em alvos biológicos, conseqüentemente é gerado o estresse oxidativo. Que por sua vez está associado

com patologias severas como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, doenças autoimunes e inflamatórias, câncer, hipertensão, entre outras, como também está relacionado com o envelhecimento (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Existem os antioxidantes sintéticos e naturais. Os sintéticos são comumente usados na indústria alimentícia para prevenir a deterioração oxidativa, permitindo que os alimentos lipídicos passem um maior tempo nas prateleiras. Os mais utilizados são: o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol, o propilgalato e o terciobutilhidroxinona (TBHQ). Porém, propriedades carcinogênicas têm sido atribuídas aos antioxidantes sintéticos (ALVES et al., 2007), o que ressalta a importância da investigação de compostos antioxidantes de fontes naturais.

Entre os antioxidantes naturais estão os enzimáticos que incluem as enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, e os não enzimáticos que são a glutathione, tióis, algumas vitaminas e metais, carotenoides, isoflavonas, polifenóis e flavonoides (SEIFRIED et al., 2007).

Os carotenoides apresentam a capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância, atuando dessa forma, como um composto capaz de inibir a oxidação de biomoléculas e protegendo os sistemas biológicos contra o dano oxidativo (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

3.2.1.1 Método de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Levando-se em consideração a complexidade envolvida na ação de antioxidantes *in vivo*, diferentes metodologias *in vitro* têm sido desenvolvidas para estimar de forma experimental simples, a capacidade antioxidante de amostras complexas, bem como sua interação com espécies reativas. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas e eles diferem entre si em relação ao mecanismo de reação (ALVES et al., 2010).

O sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de um antioxidante sobre radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Figura 6). O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

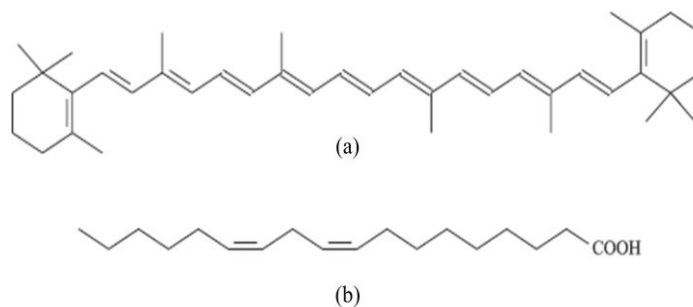


Figura 6: Estrutura do β-caroteno (a) e do ácido linoleico (b). Fonte: Alves et al. (2010).

Os valores obtidos das leituras espectrofotométricas são utilizados para calcular a inibição, através da seguinte fórmula:

$$(\%) \text{ inibição} = \left[\frac{(Abs \text{ sistema} - Abs \text{ amostra})}{Abs \text{ sistema}} \right] \times 100$$

Onde: Abs sistema= Absorbância do controle β-caroteno (t_0 - t_{120}) – absorbância do branco (t_0 - t_{120}).

Abs amostra= Absorbância da amostra (t_0 - t_{120}) – absorbância do branco (t_0 - t_{120}).

3.2.2 Fotoproteção

A Radiação UV (subdividida em UVA, UVB e UVC) tem um papel importante na saúde humana, pois ela é vital para a produção de vitamina D3, entretanto é um potente carcinogênico responsável por grande parte do câncer de pele na população (BINIEK; LEVI; DAUSKARDT, 2012). A radiação UVA é classificada em UVA1 (340-400 nm) e UVA2 (320-340 nm), caracterizada por penetrar nas camadas mais profundas da pele causando fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. A radiação UVB (290–320 nm) atinge as camadas mais superficiais da pele produzindo dano ao DNA, provocando queimaduras ou eritemas e reações alérgicas (DE OLIVEIRA et al., 2015). O terceiro tipo UVC (200–290 nm) é o mais perigoso, porém em grande parte, ele é absorvido pela camada de ozônio (HALLIDAY; CADET, 2012). A radiação solar ultravioleta na superfície da terra é aproximadamente 90-99% UVA e 1-10% UVB (BALOGH et al., 2011).

A fim de reduzir os efeitos danosos da radiação UV podem ser tomadas diferentes ações fotoprotetoras como evitar a exposição ao sol nos horários de maior intensidade, vestir roupas de proteção e utilização tópica de protetores solares (JARZYCKA et al., 2013). Os protetores solares são preparações cosméticas que possuem diversas formas de apresentação e seu princípio ativo, os filtros solares, não deve ser irritante ou sensibilizante. Eles devem recobrir e proteger a superfície da pele, e não devem ser tóxicos, já que são absorvidos traços destes através da pele ou ingeridos após a aplicação nos lábios. Finalmente, um bom protetor solar deve ser resistente à água, insípido,

inodoro e incolor, e deve ser compatível com formulações cosméticas (DE ARAÚJO; DE SOUZA, 2008).

Os filtros solares são classificados em inorgânicos (físicos) e orgânicos (químicos) (DE ARAÚJO; DE SOUZA, 2008). Os filtros inorgânicos refletem a radiação incidente e podem absorver parte delas, formando uma barreira opaca constituída pelo filme de partículas sobre a pele. Dependendo do tamanho da partícula, a proteção pode também ocorrer através da absorção (BALOGH et al., 2011; VELASCO et al., 2011). Exemplos dessa classe de filtros solares é o óxido de zinco e dióxido de titânio (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

Já os filtros orgânicos são formados por moléculas orgânicas que absorvem a radiação UV e a transforma em radiações energéticas menores e inócuas ao ser humano. Em geral são compostos aromáticos conjugados com grupos carboxílicos, tais como benzofenona-3, butil-metoxi-dibenzoil-metano, octidimetil PABA, PABA e gliceril PABA (FLOR et al., 2007). Esse mecanismo de absorção torna esses filtros susceptíveis a fotodegradação e capazes de gerar radicais livres. Dessa forma, uma alternativa para superar esse problema é a combinação de filtros orgânicos com ingredientes bioativos que possuam propriedades fotoprotetoras e antioxidantes (DE OLIVEIRA et al., 2015), a exemplo dos carotenoides. A adição desses compostos bioativos também reduz a quantidade de filtros químicos utilizados na formulação de um protetor solar, aumentando a sua segurança e diminuindo o impacto ambiental (VELASCO et al., 2008)

Considerando suas propriedades antioxidantes e fotoprotetoras, solubilidade, assim como estabilidade em emulsões de óleo, os carotenoides C50 apresentam alto potencial de aplicação em protetores solares (HEIDER et al., 2014).

3.2.2.1 Método *in vitro* para avaliação do fotoprotetor

A eficácia dos fotoprotetores pode ser determinada por metodologias *in vivo* e *in vitro*. Vários parâmetros devem ser avaliados para determinar a eficácia de uma formulação fotoprotetora. Um método *in vitro* utilizado para avaliar o fotoprotetor se baseia no valor do FPS, que está relacionado à proteção proporcionada frente à radiação UVB (VELASCO et al., 2011).

O Fator de Proteção Solar (FPS) é definido como sendo a dose mínima eritematosa na pele protegida dividida pela dose mínima eritematosa na pele não protegida. A determinação do FPS *in vitro* pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda (290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320 nm) das soluções diluídas dos compostos bioativos, com posterior tratamento matemático por meio da determinação da transmitância ou da absorbância (também reconhecido como Método de Mansur) (VELASCO et al., 2011). Para calcular o FPS utiliza-se a seguinte fórmula:

$$FPS = \frac{320}{290} \cdot FC \cdot \sum EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde: FC = fator de correção; $EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda (λ); $I(\lambda)$ = intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ); $Abs(\lambda)$ = leitura espectrofotométrica da absorbância da formulação em solução no comprimento de onda (λ).

3.3 PRODUÇÃO MICROBIANA DE CAROTENOIDES

Grande parte dos carotenoides comerciais é obtida por extração de vegetais e síntese química. Porém, encontram-se alguns problemas de produção e comercialização desses corantes de origem vegetal, como variabilidade sazonal e geográfica, as quais não podem ser controladas. E em relação à síntese química como fonte de produção de carotenoides, mesmo sendo facilmente realizada, ocorre a formação de resíduos perigosos que podem afetar o ambiente e a instabilidade da qualidade do produto. Isto resulta em uma preocupação geral com os efeitos indesejados desses pigmentos artificiais (MATA-GÓMEZ et al., 2014). Assim, a produção de carotenoides por microrganismos, ao contrário desses métodos tradicionais, demonstra segurança de utilização e vem sendo uma área de intensa investigação devido à possibilidade da obtenção de compostos de origem natural em escala industrial (LIU; WU, 2007).

Essa produção biotecnológica de carotenoides apresenta muitas vantagens, pois se trata de uma síntese natural, processo inerentemente mais rápido, altamente eficiente, pois eles podem ser facilmente gerenciados durante os processos. Ao mesmo tempo, apresenta maiores rendimentos em comparação com outros processos químicos, precisa-se de pouco espaço, é independente de condições climáticas. Finalmente, é possível produzir diferentes tonalidades de cor, com um procedimento relativamente fácil de extração e os microrganismos podem crescer em substratos baratos (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012). As condições de cultivo e os genes podem ser manipulados a fim de estimular a produção do carotenoide de interesse.

Os carotenoides são amplamente sintetizados em bactérias, fungos, leveduras e microalgas, com a função de proteger as células contra as ações letais da radiação ionizante, radiação UV e do peróxido de hidrogênio, desempenhando um papel tanto na estabilização da membrana como também na proteção contra agentes oxidantes. Por isso, os carotenoides são compostos essenciais para a sobrevivência dos microrganismos, principalmente quando se localizam em ambientes hostis

(HIGUERA-CIAPARA et al., 2004). A Tabela 2 mostra as espécies mais comumente relatadas na literatura na produção de carotenoides.

Tabela 2: Microrganismos produtores de carotenoides.

Espécies	Carotenoides principais
Cianobactérias	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina
Algas	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
Fungos e leveduras	
<i>Dacrymycesdeliquescens</i>	β -caroteno e licopeno
<i>Blakesleatrispora</i>	β -caroteno e licopeno
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e β -caroteno
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Torularodina, β - caroteno e toruleno
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Toruleno, torularodina e β -caroteno
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	β -caroteno
Bactérias	
<i>Mycobacterium brevicale</i>	Cantaxantina
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas

Fonte: Adaptada de Valduga et al. (2009).

Apesar do grande número de carotenoides microbianos já identificados e caracterizados, apenas alguns são produzidos em escala industrial e dessa forma, o interesse na eficiência de produção dos carotenoides por hospedeiros microbianos está crescendo (CUTZU et al., 2013). Entre estes, a astaxantina produzida pela levedura *Phaffia rhodozyma*, pela bactéria *Agrobacterium auranticum* e pela microalga de água doce *Haematococcus pluvialis*, β -caroteno sintetizado por *Blakesleatrispora*, zeaxantina produzida por *Flavobacterium*, já se encontram no mercado e são utilizados como aditivos alimentares (KIRTI et al., 2014; KRINSKY, 1994). Destaca-se também a

produção de β -caroteno, toruleno e torularodina por leveduras do gênero *Rhodotorula* (MATA-GÓMEZ et al., 2014).

A partir desse contexto, muitas pesquisas estão sendo direcionadas a encontrar alternativas e condições que possam induzir a síntese de carotenoides e/ou aumentar a eficiência desses sistemas biológicos de forma que eles sejam comercialmente viáveis (BHOSALE, 2004; JOSHI et al., 2003; ÚBEDA, 2008).

3.3.1 Bactérias produtoras de carotenoides

As bactérias apresentam grande potencial para gerar diversos bioprodutos e entre eles estão os pigmentos. Os carotenoides bacterianos ganharam popularidade nos últimos anos, diferente dos carotenoides mais prevalentes de frutas e produtos hortícolas. Varias são as vantagens deste tipo de aproximação, os pigmentos bacterianos apresentam uma maior biossegurança para a indústria alimentar e de rações, com vasta gama de cores, com propriedades específicas como melhor solubilidade e estabilidade (SY et al., 2015).

Em relação ao processo de produção, também apresenta vantagens como a simplicidade e o bom rendimento do processo de produção de biomassa (KERR et al., 2004). Além disso, para a produção de carotenoides por bactérias não é necessário que seja feito cultivo simultâneo de duas cepas compatíveis. Outra vantagem é que a viscosidade do meio de cultivo não aumenta como ocorre quando se utiliza o fungo *Blakeslea trispora*, também não é exigida alta luminosidade e alta salinidade como ocorre no cultivo da microalga *Dunaliella* sp. (BHOSALE; BERNSTEIN, 2004). Finalmente, destaca-se a diversidade de carotenoides que podem ser sintetizados pelas bactérias, que podem conter 30, 40, 45 e até mesmo 50 carbonos em sua cadeia. Enquanto que em plantas superiores, algas e fungos, a maioria dos carotenoides produzidos contém somente até 40 carbonos (MERCADANTE et al., 2004; SY et al., 2015).

Como resultado, a produção biotecnológica de pigmentos naturais através de bactérias e suas aplicações têm sido um dos campos emergentes de investigação, inclusive na classe dos carotenoides, como pode ser observada na Tabela 3. A maior parte desses estudos encontra-se em fase de pesquisa e desenvolvimento.

Tabela 3: Pigmentos naturais produzidos por bactérias e suas aplicações.

Bactéria	Pigmentos/Molécula	Cor	Aplicações
<i>Agrobacterium aurantiacum</i> , <i>Paracoccus carotinifaciens</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Rosa-vermelho	Suplemento alimentar
<i>Rhodococcus maris</i>	Beta-caroteno	Azul-avermelhado	Usado para tratar vários distúrbios como a protoporfiria eritropoiética, reduz o risco de câncer de mama
<i>Bradyrhizobium sp.</i> , <i>Haloferax alexandrinus</i>	Canthaxantina	Vermelho-escuro	Corantes em alimentos, bebidas e preparações farmacêuticas
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigoidina	Azul	Proteção contra o stress oxidativo
<i>Rugamonas rubra</i> , <i>Streptovorticillium rubrreticuli</i> , <i>Vibrio gaogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia rubidaea</i>	Prodigiosina	Vermelho	Anticâncer, imunossupressor, antifúngico, algicida; Tingimento (têxtil, velas, papel, tinta)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piocianina	Azul-verde	Metabolismo oxidativo, redução da inflamação local
<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Janthinobacterium lividum</i>	Violaceína	Roxo	Atividades farmacêuticas (antioxidantes, imunomoduladoras, antitumorais, antiparasitárias); Tinturaria (têxteis), cosméticos (loção)
<i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxantina	Amarelo	Usado para tratar distúrbios diferentes, principalmente com afetar os olhos
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xanthomonadina	Amarelo	Marcadores quimiotaxonômicos e diagnósticos

Fonte: Adaptada de Venil; Zakaria; Ahmad (2013).

Os trabalhos de pesquisa têm sido direcionados a fim de encontrar novas fontes de pigmentos e em melhorar os rendimentos de produção através de processos de otimização, seja através da melhoria da estirpe, ou através de mudanças nas condições e meios de crescimento

(VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013). Nessa perspectiva, podem-se obter produções eficientes de carotenoides a partir de bactérias de modo sustentável e ambientalmente amigável, com segurança, aumentando assim a aplicabilidade desses pigmentos de origem natural nos diversos setores industriais, além da redução dos custos de produção (AHMAD et al., 2012).

3.3.2 Fatores que influenciam a produção bacteriana de carotenoides

Os fatores físicos (luminosidade, temperatura, pH e taxa de aeração) e a composição do meio de cultivo (fonte de carbono e de nitrogênio, presença de aminoácidos, de íons metálicos, de solventes orgânicos e de outros compostos químicos) podem afetar a produção de carotenoides por microrganismos (ÚBEDA, 2008). Dessa forma, ajustando e alterando tais fatores através de estratégias de planejamentos fatoriais, por exemplo, pode-se obter o aumento da biossíntese de carotenoides ou induzir a síntese de um carotenoide específico (BHOSALE, 2004).

Um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos microrganismos é a temperatura, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese (VALDUGA et al., 2009). A temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides e por sua vez, mudanças na concentração enzimática definitivamente controlam o nível de carotenoides produzidos por microrganismos (HAYMAN et al., 1974). No estudo de Goswami; Chaudhuri; Dutta (2010) foram testadas diferentes temperaturas (4°C-45°C) em experimentos com um cultivo de bactéria produtora de carotenoide amarelo, onde a máxima concentração de carotenoide ocorreu com o cultivo a 30°C. Em outro estudo de produção de carotenoide amarelo pela bactéria *Cupriavidus sp.* USMAHM13, Ramachandran; Iqbal; Amirul (2014) observou que a máxima produção de pigmento foi obtida a 28°C.

Outro parâmetro importante na formação de carotenoides é a irradiação de luz. Esta pode afetar positivamente a produção e o acúmulo de carotenoides em algas, fungos e bactérias, porém a intensidade e forma de iluminação variam com o microrganismo. A fotoindução pode agir de duas maneiras, primeiro o efeito da luz age sobre o crescimento do microrganismo exercendo papel fundamental como estimulante da produção. Na segunda, considera-se que o acúmulo de carotenoides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides (ANJOS, 2013; BHOSALE, 2004). Alguns trabalhos demonstram que determinadas bactérias biossintetizam carotenoides contra os danos causados pela luz. Segundo Arakawa et al. (1977) o crescimento da bactéria *Flavobacterium sp.* TK-70 foi inibido pela luz, enquanto que a produção de carotenoides aumentou quando a luz foi incidida numa intensidade superior a 1600 lx. Já em outro trabalho o efeito da luz no cultivo bacteriano foi mínimo ou quase

inexistente em relação à produção volumétrica de carotenoides totais por *Kocuria rhizophila* (ÚBEDA, 2008). Considerando isso, o estudo da luz como fator de influência na síntese de carotenoides ainda gera muitas dúvidas, demonstrando que atuação desse fator também depende do tipo de microrganismo em estudo.

Outros estudos mostram que a aeração da cultura apresenta um papel importante na síntese de carotenoides. Por exemplo, Masetto et al. (2001) avaliaram a influência da velocidade de agitação (200 e 600 rpm) e da taxa de aeração (1 e 2 vvm) na produção de zeaxantina por *Flavobacterium* sp. (ATCC 21588). As maiores concentrações de crescimento celular, de produção de carotenoides totais e de zeaxantina foram obtidas no nível mais alto testado, correspondente a 600 rpm e 2 vvm. Os resultados de Shatila; Yusef; Holail (2013) também mostraram que a aeração reforça a produção de carotenoides, visto que observaram que os carotenoides extraídos de uma estirpe de *Exiguobacterium aurantiacum* FH foram produzidos com alto rendimento após dois dias em condições de agitação, a 30°C de incubação.

3.3.3 Estratégias de otimização da bioprodução de carotenoides

A fim de atingir uma produção de pigmentos com alto rendimento empregando cultura de microrganismos fazem-se necessárias estratégias de otimização das condições de cultura (PAREKH; VINCI; STROBEL, 2000). Essas envolvem ensaios testando vários parâmetros, tais como componentes do meio, condições operacionais, pH, temperatura, luminosidade, arejamento, agitação, entre outros (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

Entre as técnicas empregadas, o uso de desenho experimental estatístico vem ganhando importância nos estudos para otimização de bioprocessos, como a produção dos pigmentos. Essas ferramentas de análise, como o desenho fatorial, permitem analisar de forma objetiva diversas variáveis, gerando gráficos de respostas que permitem estudar o efeito da variação simultânea de uma série de fatores de forma independente ou da interação entre eles (GHARIBZAHEDI et al., 2012; GOSWAMI et al., 2012). A aplicação dessa técnica tem mostrado ser eficaz em maximizar os rendimentos, diminuir a variabilidade do produto, assim como em reduzir o tempo de desenvolvimento do bioprocessos, além de diminuir os custos (GOSWAMI et al., 2012; VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

Por exemplo, Higuera-Ciapara et al. (2004) empregando a técnica de desenho experimental otimizou a produção de biomassa para 0,658 g/L e de carotenoides totais em 1517,4 µg/g, em experimentos com *Thermus filiformis* sob influência das variáveis temperatura, pH e concentrações de extrato de levedura. Em outro estudo, foi possível aperfeiçoar a produção de cantaxantina por *D. natronolimnaea* HS-1 a partir de soro de queijo com produção máxima de cantaxantina de 2871±76

µg/L, avaliando as variáveis pH, concentração de soro de queijo e extrato de levedura (KHODAIYAN; RAZAVI; MOUSAVI, 2008). Goswami et al. (2012) também utilizou essa ferramenta e obteve uma produção máxima de cantaxantina de 121,53 mg/L por *Dietzia maris* NIT-D, variando os parâmetros do processo pH, temperatura, velocidade de agitação e percentagem do inóculo.

3.4 BACTÉRIA *Kocuria palustris*

Kocuria palustris é uma bactéria pertencente ao gênero *Kocuria*, representante da família *Micrococcaceae*, da ordem *Actinomycetales* e foi descrita por Kovács et al. (1999). Stackebrandt et al. (1996) propôs o gênero *Kocuria* para acomodar actinobactérias distintas filogeneticamente, que anteriormente eram classificadas no Gênero *Micrococcus*. O gênero possui 17 espécies com nomes validamente publicados (KAUR et al., 2011). Embora seja isolado de várias fontes, o tamanho desse gênero é relativamente pequeno entre os actinomicetos, o que sugere que cada espécie de *Kocuria* é altamente adaptada ao seu nicho ecológico (PALERMO et al., 2016).

Kovács et al. (1999) descreveu *K. palustris* como bactérias aeróbias, gram-positivas, com células esféricas de coloração amarela e com bordas irregulares, ocorrendo em pares, tétrades e pacotes, entre 1,0-1,5 µm de diâmetro, que não são móveis e não produzem endósporos. São encontradas em diversos nichos, tais como amostras de solo, amostras clínicas, alimentos fermentados, flora oral e da pele (SHARMA; KHATRI; SUBRAMANIAN, 2014), porém existe pouca quantidade de informações sobre essa espécie. Apresenta potencial para degradação de óleo diesel comercial e intemperizado (MARIANO et al., 2008), para a biodegradação de polietileno (HARSHVARDHAN; JHA, 2013), possui resistência a superfícies metálicas (SANTO; MORAIS; GRASS, 2010), capacidade para tratamento de águas residuais contendo amônia, descoberta que gerou patente “*Kocuria palustris* strain and applications” (高会杰, 2013) e já foi relatada como produtora de novo composto bioativo denominado kocurina contra *S. aureus* resistente à metilicina (PALOMO et al., 2013).

Sabe-se que o gênero *Kocuria* possui potenciais espécies produtoras de carotenoides, como mostram os estudos de Kulkarni et al. (2014) que identificou a produção de carotenoide amarelo por *Kocuria flava*. Yusef; Belal; El-Sharouny (2014) encontrou que *Kocuria carniphila* produz β-caroteno e xantofilas, e *Kocuria polaris* sintetiza β-caroteno e equinenona. E o estudo de Úbeda (2008) mostrou a produção do carotenoide sarcinaxantina por *Kocuria rhizophila*. Porém, até o momento não foram encontrados trabalhos relacionando a espécie *Kocuria palustris* com a produção de carotenoides.

3.5 DOMÍNIO CAATINGA

Domínio exclusivamente brasileiro, sendo considerado o quarto maior ecossistema do Brasil e com uma área de 840.000 km², a Caatinga ocupa aproximadamente 10% do território nacional e abriga mais de 23 milhões de pessoas. Sendo composta pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (SANTOS; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2011) (Figura 7).



Figura 7: Localização do Domínio Caatinga na região Nordeste do Brasil. Fonte: Loiola; De Araújo Roque; De Oliveira (2012).

É um domínio que apresenta heterogeneidade de relevo, clima, solo e vegetação, constituído predominantemente por uma floresta espinhosa (6-10 m de altura) com pequenos arbustos e folhas finas, que são em sua maioria decíduas, onde se encontram cactos e bromélias (Figura 8). O termo “Caatinga” significa “mata branca” na língua tupi-guarani, pois se refere às espécies vegetais caducifólias, que caem na época de seca em resposta à escassez de água e suas hastes ficam esbranquiçadas dominando a paisagem (MOURA, 2015; SANTOS; ALMEIDA-CORTEZ; FERNANDES, 2011).



Figura 8: Aspecto geral da vegetação predominante da Caatinga. Fontes: Loiola; De Araújo Roque; De Oliveira (2012); Moura (2015).

Possui os valores meteorológicos mais extremos do país, a mais forte insolação, a mais baixa nebulosidade, baixas taxas de precipitação anual (abaixo de 800 mm) e altas temperaturas diurnas, variando entre 23°C e 27°C, enquanto o solo pode alcançar temperaturas de cerca de 60°C (APGAUA et al., 2014; MENEZES et al., 2015).

O solo da Caatinga é um habitat bastante peculiar com características próprias, cujas atividades biológicas são extremamente ricas e ainda pouco exploradas. O solo desses ambientes áridos ou semiáridos, considerado como ambiente hostil ou extremo, é reconhecido como ricos habitats com microrganismos produtores de moléculas naturais com potencial biotecnológico (DUARTE et al., 2012; SILVA; MARTINS; SILVEIRA, 2015). Um exemplo disso é a produção de pigmentos carotenoides por bactérias para minimizar os efeitos de dano oxidativo causado por alta incidência solar.

O grupo dos actinomicetos possui algumas espécies produtoras de carotenoides, entre elas estão alguns representantes da família *Micrococcaceae*. Esse grupo cresce em condições extremas e poucos estudos foram realizados, é representativo em termos de riqueza e diversidade (CANGANELLA; WIEGEL, 2011; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; SILVA; MARTINS; SILVEIRA, 2015). Um exemplo de bactéria pertencente a essa família, é a espécie *Micrococcus luteus*, que em um estudo de Schimdt (2016) foi isolada do solo da Caatinga e caracterizada como produtora de carotenoide.

Ao ser comparada com outras regiões semiáridas do mundo, a diversidade biológica da Caatinga é extremamente significativa (TABARELLI; SILVA, 2003), além de conferir valores biológicos e econômicos denotados ao Brasil. Mesmo com essa rica diversidade de espécies, inclusive de microrganismos, e com um alto grau de endemismo de plantas e animais, ainda há

poucos estudos ecológicos neste domínio e menos de 1% da Caatinga é protegido por áreas de conservação (LEAL et al., 2005).

Pouco se sabe sobre as bactérias produtoras de carotenoides existentes na Caatinga, a informação obtida é que apenas 1% de todas as bactérias desse domínio (compreendendo as pigmentadas e não pigmentadas) já foram descobertas e descritas, isso indica que existe uma vasta biodiversidade a ser explorada, inclusive como fonte natural de novos carotenoides (MARTIN et al., 2003). Diante desse contexto, investimentos em pesquisas de bioprospecção na Caatinga, destacando-se a procura por bactérias produtoras de carotenoides, podem representar o conhecimento de suas bases, que por sua vez poderão definir ações e estratégias para seu aproveitamento econômico. Consequentemente, poderão promover a geração de produtos biotecnológicos com aplicações na saúde e nos diversos setores industriais, por meio de uma tecnologia própria sem agredir as relações naturais do ambiente e que preservem sua biodiversidade da ameaça de extinção (LOIOLA; DE ARAÚJO ROQUE; DE OLIVEIRA, 2012).

4 REFERÊNCIAS

- AHMAD, W. A.; AHMAD, W. Y. W.; ZAKARIA, Z. A.; YUSOF, N. Z. Application of bacterial pigments as colorant. In: (Ed.). **Application of Bacterial Pigments as Colorant**: Springer, 2012. p.57-74.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical engineering journal**, v. 35, n. 2, p. 107-113, 2007.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. D. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. 2010.
- AMORIM-CARRILHO, K.; CEPEDA, A.; FENTE, C.; REGAL, P. Review of methods for analysis of carotenoids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49-73, 2014.
- ANJOS, M. N. V. Produção de astaxatina por *Mucor circinelloides* utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo sob a influência de luz azul. 2013.
- APGAUA, D. M. G.; DOS SANTOS, R. M.; PEREIRA, D. G. S.; DE OLIVEIRA MENINO, G. C.; PIRES, G. G.; FONTES, M. A. L.; TNG, D. Y. P. Beta-diversity in seasonally dry tropical forests (SDTF) in the Caatinga Biogeographic Domain, Brazil, and its implications for conservation. **Biodiversity and conservation**, v. 23, n. 1, p. 217-232, 2014.
- ARAKAWA, Y.; HASHIMOTO, K.; SHIBATA, A.; UMEZU, M. Studies on the biosynthesis of carotenoids by microorganism. II. **Effect of visible light on the growth and carotenoids production of Flavobacterium sp. TK-70**. **Hakko Kogaku Kaishi**, v. 55, p. 319-24, 1977.
- ARIMBOOR, R.; NATARAJAN, R. B.; MENON, K. R.; CHANDRASEKHAR, L. P.; MOORKOTH, V. Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 3, p. 1258-1271, 2015.
- ARMSTRONG, G. A.; HEARST, J. E. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 2, p. 228-237, 1996.
- ARULSELVI, I.; UMAMAHESWARI, S.; KARTHIK, C.; JAYAKRISHNA, C. Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 2014, 2014.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

BANZATTO, D.; FREITA, L. A. D.; MUTTON, M. J. R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, p. 14-18, 2013.

BAUERNFEIND, J.; ADAMS, C.; MARUSICH, W. Carotenes and other vitamin a precursors in animal feed [Includes nutrition studies]. **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: Technological and nutritional applications**, 1981.

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 351-361, 2004.

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. β -Carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 565-571, 2004.

BINIEK, K.; LEVI, K.; DAUSKARDT, R. H. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 17111-17116, 2012.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-1558, 1995.

CANGANELLA, F.; WIEGEL, J. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. **Naturwissenschaften**, v. 98, n. 4, p. 253-279, 2011.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.

CHENG, Y.-T.; YANG, C.-F. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 61, p. 270-275, 2016.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

CUTZU, R.; COI, A.; ROSSO, F.; BARDI, L.; CIANI, M.; BUDRONI, M.; ZARA, G.; ZARA, S.; MANNAZZU, I. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 1009-1017, 2013.

DE ARAÚJO, T.; DE SOUZA, S. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia plena**, v. 4, n. 11, 2008.

DE OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. D.; RUGNO, C. M.; KOJIMA, M.; DE OLIVEIRA PINTO, C. A. S.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; ROSADO, C.; MOTA, J.; VELASCO, M. V. R. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 154-159, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUARTE, R. T.; NÓBREGA, F.; NAKAYAMA, C. R.; PELLIZARI, V. H. Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. **International Journal of Astrobiology**, v. 11, n. 4, p. 325, 2012.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153, 2007.

FLORA, S. J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n. 4, p. 191-206, 2009.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M.; MOAYEDI, V. High efficiency canthaxanthin production by a novel mutant isolated from *Dietzia natronolimnaea* HS-1 using central composite design analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 345-354, 2012.

GIOVANNUCCI, E. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 10, p. 852-859, 2002.

GOODWIN, T. [29] Biosynthesis of carotenoids: An overview. **Methods in enzymology**, v. 214, p. 330-340, 1993.

GOSWAMI, G.; CHAKRABORTY, S.; CHAUDHURI, S.; DUTTA, D. Optimization of process parameters by response surface methodology and kinetic modeling for batch production of canthaxanthin by *Dietzia maris* NIT-D (accession number: HM151403). **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 8, p. 1375-1388, 2012.

GOSWAMI, G.; CHAUDHURI, S.; DUTTA, D. Effect of pH and temperature on pigment production from an isolated bacterium. **Chemical Engineer. Trans**, v. 20, p. 127-132, 2010.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 1461520339.

GRUSZECKI, W. I.; STRZAŁKA, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 108-115, 2005.

HAILEI, W.; ZHIFANG, R.; PING, L.; YANCHANG, G.; GUOSHENG, L.; JIANMING, Y. Improvement of the production of a red pigment in *Penicillium* sp. HSD07B synthesized during co-culture with *Candida tropicalis*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 6082-6087, 2011.

HALLIDAY, G. M.; CADET, J. It's all about position: the basal layer of human epidermis is particularly susceptible to different types of sunlight-induced DNA damage. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 265-267, 2012.

HARSHVARDHAN, K.; JHA, B. Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. **Marine pollution bulletin**, v. 77, n. 1, p. 100-106, 2013.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C. O.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of bacteriology**, v. 120, n. 3, p. 1339-1343, 1974.

HEIDER, S. A.; PETERS-WENDISCH, P.; WENDISCH, V. F.; BEEKWILDER, J.; BRAUTASET, T. Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 10, p. 4355-4368, 2014.

HEINRICH, U.; GÄRTNER, C.; WIEBUSCH, M.; EICHLER, O.; SIES, H.; TRONNIER, H.; STAHL, W. Supplementation with β -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 1, p. 98-101, 2003.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.; ARGÜELLES-MONAL, W. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 1, p. 41-45, 2004.

JARZYCKA, A.; LEWIŃSKA, A.; GANCARZ, R.; WILK, K. A. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 128, p. 50-57, 2013.

JOSHI, V.; ATTRI, D.; BALA, A.; BHUSHAN, S. Microbial pigments. **Indian journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 362-369, 2003.

KAISER, P.; SURMANN, P.; VALLENTIN, G.; FUHRMANN, H. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n. 1, p. 142-149, 2007.

KAUR, C.; KAUR, I.; RAICHAND, R.; BORA, T. C.; MAYILRAJ, S. Description of a novel actinobacterium *Kocuria assamensis* sp. nov., isolated from a water sample collected from the river Brahmaputra, Assam, India. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 721-726, 2011.

KERR, S.; CALE, C.; CABRAL, J.; VAN KEULEN, F. Factors enhancing lycopene production by a new *Mycobacterium aurum* mutant. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 2, p. 103-108, 2004.

KHODAIYAN, F.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M. Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 from cheese whey using statistical experimental methods. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 415-422, 2008.

KIRTI, K.; AMITA, S.; PRITI, S.; JYOTI, S. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. **Advances in Biology**, v. 2014, 2014.

KISER, P. D.; GOLCZAK, M.; PALCZEWSKI, K. Chemistry of the retinoid (visual) cycle. **Chemical reviews**, v. 114, n. 1, p. 194-232, 2013.

KOVÁCS, G.; BURGHARDT, J.; PRADELLA, S.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E.; MÀRIALIGETI, K. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 167-173, 1999.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

KULKARNI, V. M.; GANGAWANE, P. D.; PATWARDHAN, A. V.; ADIVAREKAR, R. V. Dyeing of Silk/Wool Using Crude Pigment Extract From An Isolate *Kocuria Flava* SP. HO-9041. **Octa Journal of Environmental Research**, v. 2, n. 4, 2014.

LEAL, I. R.; DA SILVA, J.; CARDOSO, M.; TABARELLI, M.; LACHER, T. E. Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of northeastern Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 701-706, 2005.

LEFSRUD, M. G.; KOPSELL, D. A.; KOPSELL, D. E.; RANDLE, W. M. Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1764-1771, 2006.

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Biochemical engineering journal**, v. 36, n. 2, p. 182-189, 2007.

LOIOLA, M. I. B.; DE ARAÚJO ROQUE, A.; DE OLIVEIRA, A. C. P. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. **Notas Técnicas**, p. 14, 2012.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica chimica acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LÜ, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 109-115, 2012.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 65-70, 2007.

MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial pigments: a review. **Int J Microbial Res Technol**, v. 1, n. 4, p. 361-365, 2012.

MÄNNISTÖ, S.; SMITH-WARNER, S. A.; SPIEGELMAN, D.; ALBANES, D.; ANDERSON, K.; VAN DEN BRANDT, P. A.; CERHAN, J. R.; COLDITZ, G.; FESKANICH, D.; FREUDENHEIM, J. L. Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 1, p. 40-48, 2004.

MAPARI, S. A.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231-238, 2005.

MARASCO, E.; SCHMIDT-DANNERT, C. Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. **Applied Biotechnology Food Science and Policy**, v. 1, p. 145-158, 2003.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. D. F. D.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 133-142, 2008.

MARTIN, V. J.; PITERA, D. J.; WITHERS, S. T.; NEWMAN, J. D.; KEASLING, J. D. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 796-802, 2003.

MASETTO, A.; FLORES-COTERA, L. B.; DÍAZ, C.; LANGLEY, E.; SANCHEZ, S. Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 55-58, 2001.

MATA-GÓMEZ, L. C.; MONTAÑEZ, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C. N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

MENEZES, K. A. S.; DE OLIVEIRA NUNES, G. F.; SAMPAIO, A. A.; DE TARSO AIDAR, S.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Seedling development of nodulating and non-nodulating native legumes in soils from Brazilian Caatinga biome. **Plant Science Today**, v. 2, n. 2, p. 56-59, 2015.

MERCADANTE, A.; EGELAND, E.; BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids handbook. **Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds**, 2004.

MIKI, W.; OTAKI, N.; YOKOYAMA, A.; IZUMIDA, H.; SHIMIDZU, N. Okadaxanthin, a novel C50-carotenoid from a bacterium, *Pseudomonas* sp. KK10206C associated with marine sponge, *Halichondria okadai*. **Experientia**, v. 50, n. 7, p. 684-686, 1994.

MOURA, P. A. D. **Screening das atividades antioxidantes e anticoagulantes de plantas do bioma Caatinga**. 2015. 79. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas.

MURAGUCHI, T.; OKAMOTO, K.; MITAKE, M.; OGAWA, H.; SHIDOJI, Y. Polished rice as natural sources of cancer-preventing geranylgeranoic acid. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 49, n. 1, p. 8-15, 2011.

NETZER, R.; STAFSNES, M. H.; ANDREASSEN, T.; GOKSØYR, A.; BRUHEIM, P.; BRAUTASET, T. Biosynthetic pathway for γ -cyclic sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: Heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 21, p. 5688-5699, 2010.

OLSON, J. A.; KRINSKY, N. I. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1547-1550, 1995.

PALERMO, B. R. Z.; CASTRO, D. B.; PEREIRA, L. B.; CAUZ, A. C. G.; MAGALHÃES, B. L.; CARLOS, C.; DA COSTA, F. L.; SCAGION, G. P.; HIGA, J. S.; ALMEIDA, L. D. Draft genome sequence of *Kocuria* sp. SM24M-10 isolated from coral mucus. **Genomics data**, v. 7, p. 121-123, 2016.

PALOMO, S.; GONZÁLEZ, I.; DE LA CRUZ, M.; MARTÍN, J.; TORMO, J. R.; ANDERSON, M.; HILL, R. T.; VICENTE, F.; REYES, F.; GENILLOU, O. Sponge-derived Kocuria and Micrococcus spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. **Marine drugs**, v. 11, n. 4, p. 1071-1086, 2013.

PAREKH, S.; VINCI, V.; STROBEL, R. Improvement of microbial strains and fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 287-301, 2000.

PFANDER, H. [1] Carotenoids: An overview. **Methods in enzymology**, v. 213, p. 3-13, 1992.

RAMACHANDRAN, H.; IQBAL, M. A.; AMIRUL, A.-A. Identification and Characterization of the Yellow Pigment Synthesized by Cupriavidus sp. USMAHM13. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 2, p. 461-470, 2014.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, DC: Intl. **Life Sciences Inst.(ILSI) Press**, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods**. Citeseer, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus handbook for carotenoid analysis**. Citeseer, 2004.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONAT, A. Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 25, p. 17-22, 2015.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SANCHEZ, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 528-534, 2000.

SANTO, C. E.; MORAIS, P. V.; GRASS, G. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1341-1348, 2010.

SANTOS, J. C.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S. D.; FERNANDES, G. W. Richness of gall-inducing insects in the tropical dry forest (caatinga) of Pernambuco. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 45-54, 2011.

SCHMIDT-DANNERT, C. Engineering novel carotenoids in microorganisms. **Current opinion in biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 255-261, 2000.

SCHMIDT, K. D. C. **Avaliação da produção de corantes naturais em bactérias isoladas do Semiárido brasileiro**. 2016. 79. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SHARMA, G.; KHATRI, I.; SUBRAMANIAN, S. Draft genome sequence of *Kocuria palustris* PEL. **Genome Announc**, v. 2, n. 1, p. e01261-13, 2014.

SHATILA, F.; YUSEF, H.; HOLAIL, H. Pigment production by *Exiguobacterium aurantiacum* FH, a novel Lebanese strain. **International journal of current Microbiology and Applied science**, v. 2, p. 176-191, 2013.

SILVA, V.; MARTINS, C. M.; SILVEIRA, S. C. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2026-2036, 2015.

STACKEBRANDT, E.; KOCH, C.; GVOZDIK, O.; SCHUMANN, P. Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 366-366, 1996.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 101-107, 2005.

SY, C.; DANGLES, O.; BOREL, P.; CARIS-VEYRAT, C. Stability of bacterial carotenoids in the presence of iron in a model of the gastric compartment–Comparison with dietary reference carotenoids. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 572, p. 89-100, 2015.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. D. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. **Leal, IR, JMC Silva & M. Tabarelli (Eds.)**, p. 777-796, 2003.

ÚBEDA, B. T. **Estudo da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria rhizophila*** 2008. 174. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; FURIGO, A. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VELASCO, M.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C.; KANEKO, T.; BABY, A. R. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro)-revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2011.

VELASCO, M. V. R.; SARRUF, F. D.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International journal of pharmaceutics**, v. 363, n. 1, p. 50-57, 2008.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065-1079, 2013.

VETTER, W.; ENGLERT, G.; RIGASSI, N.; SCHWIETER, U.; ISLER, O. **Carotenoids**: Birkhauser Verlag: Basel, Switzerland: 243-266 p. 1971.

WISNIEWSKA, A.; SUBCZYNSKI, W. K. Effects of polar carotenoids on the shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1368, n. 2, p. 235-246, 1998.

YUSEF, H. H.; BELAL, M. A.; EL-SHAROUNY, E. E. Production of Natural Pigments From Novel local Psychrotolerant *Kocuria* spp. **Life Science Journal**, v. 11, n. 9, 2014.

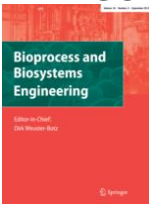
ZHAI, Y.-G.; HAN, M.; ZHANG, W.-G.; QIAN, H. Carotene production from agro-industrial wastes by *Arthrobacter globiformis* in shake-flask culture. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 355-369, 2014.

高会杰, 张., 孙丹凤, 李宝忠. *Kocuria palustris* strain and applications thereof: Google Patents 2013.

ARTIGO

Optimization of the carotenoid production by *Kocuria palustris* from Brazilian Caatinga region and analysis of biological activities

Tayane de Cássia Dias Mendes Silva^{1*}, Raquel de Fátima Rodrigues de Souza², Brígida Thais Luckwu de Lucena³, Esteban Espinosa Vidal², Márcia Vanusa da Silva¹



¹Departament of Biochemistry, Center of Biosciences, Federal University of Pernambuco, Zip code: 50670-901, Recife-PE, Brazil

²Center of Strategic Technologies Northeast (CETENE), CEP: 50.740-540, Recife-PE, Brazil

³Center of Applied Social and Biological Sciences, State University of Paraíba Campus V, Zip code: 58429-500, João Pessoa-PB, Brazil

* Corresponding author at: Tayane de Cássia Dias Mendes Silva, ¹Departament of Biochemistry, Center of Biosciences, Federal University of Pernambuco, Zip code: 50670-901, Recife-PE, Brazil.
E-mail addresses: tayanecassiamendes@gmail.com Tel: +55 81 21268000

Abstract

The biotechnological production of carotenoids by microorganisms is a viable alternative, including bacteria the genus *Kocuria*. The optimization of the process conditions generates a higher yield and contributes to the reduction of costs. Thus, this study investigated the optimization of the carotenoid production by bacteria isolated from the Caatinga region, by factorial design, using temperature range, luminosity, agitation, spiral presence and bacterial isolate type, as well as analyzed their biological activities. The isolates of color yellow FT-7.22 and FT-5.12 were identified such as *Kocuria palustris*. Maximized production of carotenoids in Erlenmeyer flasks, with Tryptic Soy Broth as the medium, was found at 30°C, with light, at 250 rpm and with plastic spirals. Sarcinaxanthin and derivatives, as well as lycopene, were the major compounds produced. *Kocuria palustris* FT-7.22 generated 112.48 mg/L of sarcinaxanthin from the production in bioreactor (10L). Application as antioxidant showed rate of 80.6 ($\pm$ 0.21) % and sun protection factor was 6.81 ($\pm$ 0.64) for *Kocuria palustris* FT-7.22. A high carotenoid production was successfully obtained and *Kocuria palustris* FT-7.22 is a potential producer of sarcinaxanthin. Identification of these biological activities can be useful to industries such as cosmetics.

Keywords: *Kocuria palustris*; carotenoid-sarcinaxanthin; experimental design; antioxidant activity; photoprotective activity.

List of symbols

OD: Optical density

PCR: Polymerase Chain Reactions

PTFE: Polytetrafluoroethylene

RNA: Ribonucleic acid

Rpm: Rotation per minute

RT: Retention time

UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography

UV: Ultraviolet

UV-Vis: Visible Ultraviolet

Introduction

Carotenoids belong to the group of natural pigments responsible for the yellow, orange and red colors[1] in fruits, vegetables, flowers, fish, birds and microorganisms, used in the food and feed (dyes and nutritional supplements), pharmaceutical and cosmetics industries[2].

Different structures allow carotenoids to exercise a number of functions, in addition to wide use as colorants and for food fortification; they are also used for their antioxidant, pro-vitamin A and anti-cancer activities[3]. These properties result in potential biological functions beneficial to health, such as strengthening the immune system and reducing the risk of degenerative diseases (cancer, cardiovascular disease, macular degeneration and cataracts)[4].

The production of carotenoids results in more than 600 known structures, where more than 95% are formed by a chain of 40 carbons; a small number are formed from 30 carbons; and even fewer formed by 50 carbons, having been differentiated by their cyclic modifications, introduction of oxygenated groups, among others[5]. Few studies have been conducted with the C50 carotenoids, known to have several conjugated double bonds and with at least one hydroxyl group that contribute to strong photoprotective and antioxidant properties[6]. These properties, in addition to the golden yellow color, solubility and stability of oil emulsions, make this a high-potential application in sunscreens and other cosmetics, thus needing to stimulate the development of more studies with this type carotenoid[7].

Microbial production through fermentation results in raw material viable for carotenoid synthesis, independent of weather conditions, external factors, and seasonal supply. The ability to

minimize variations in production can ensure metabolites of interest[8], with a broad color range, rapid production by fermentation and easy manipulation of the gene. Given these attributes, a number of microorganisms that are producers of carotenoids are being studied, such as the bacteria *Arthrobacter globiformis*[9], *Dietzia maris*[10], *Micrococcus luteus*[11,6] and *Kocuria rhizophila*[12].

Studies of the optimization of carotenoid production depend on the strains, which ones can produce variable quantities of different carotenoids, and on the cultivation conditions that can affect metabolite production. By modifying physical factors such as temperature, light and aeration the concentrations of pigments produced can be altered[13,14]. Optimization of the process conditions by biotechnological means generates a higher yield and contributes to the reduction of costs.

In the region of Caatinga, Brazil, research activities in microbial diversity and the technological exploitation of microbial resources are still quite limited, according to Oliveira[15]. Among the microorganisms, only 1% of all bacteria (including pigmented and non-pigmented) have been discovered and described, indicating the wide biodiversity being explored as a new natural source of carotenoids.

Within this context, two yellow color bacterial isolates from the Caatinga Domain were selected for this study, both in order to characterize and optimize the production of carotenoids, as well as to analyze their biological activities. For this purpose, molecular identification was carried out, and optimization was investigated by factorial design, using data from the fermentative and kinetics parameters, characterizing the carotenoid production profile by liquid chromatography, and validating pigment enriched extracts in assays for antioxidants and photoprotective activities.

Materials and methods

Bacterial identification

Bacterial strains (FT-5.12 and FT-7.22) used in this study were obtained from Molecular Biology Laboratory – UEPB, João Pessoa, Paraíba. They were isolated from soil samples from the Brazilian Caatinga and preserved in a 20% glycerol solution at -20°C. Then, these isolates were identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene at the Molecular Biology Laboratory of the Department of Biochemistry at UFPE.

The 16S rRNA was amplified by PCR using the primers forward (5'-3'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and reverse (5'-3'-AAGGAGGTGATCCAGCC) under specified conditions for amplification of the 16S rDNA gene[16]. All reactions were analyzed by agarose gel electrophoresis. The 16S rDNA gene amplified products were purified using a PureLink purification kit (Invitrogen, USA) and the identity of these isolates was obtained by sequencing by

an automated DNA sequencer (Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzers, California USA). The sequences were analyzed using Pregap4 and Gap4 tools in a STADEN 1.6 software package. The 16S rRNA nucleotide sequences are deposited in the GenBank under the accession (KX990291 and KX990292). The partial 16S rRNA gene sequence was submitted to a search for similarity in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) nucleotide database [17,18] and Ribosomal Database Project (RDP). Bacterial identification was assumed when the query sequence showed similarity > 97% for the 16S rRNA gene sequence [19].

Kinetic Tests

The bacterial isolates FT-5.12 and FT-7.22 were cultured in a TSB medium (Acumedia Neogen, Michigan USA) (casein 17.0 g/L, soybean, 3.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, K₂HPO₄ 2.5 g/L, dextrose 2.5 g/L). Cells were grown under agitation at 30°C (150 rpm) (TECNAL TE-420, São Paulo Brazil) in Erlenmeyer flasks (250 ml) with vials containing 20% of the total volume.

All kinetic growth began with an optical density of cell concentration (OD, 600nm) of 0.1 from which collections were performed at intervals of 0, 12, 18, 24, 36, 42 and 48 hours.

Optimization of carotenoid production by experimental design

The initial factorial design was performed to evaluate the effect of light (L), incubation temperature (T) and bacterial isolate type (Kpa). Based on these results, a second factorial design was employed with strategies for cell culture homogenization (Sp) (presence or absence of spirals) and agitation (A), (Table 1), based on methodologies of Mandelli et al. [13] and Maldonado et al. [14]. From these results carotenoid total production (µg/L) and specific production of carotenoids (µg/g) were evaluated in order to optimize the production of carotenoids.

Table 1 Independent variable levels used in the factorial design

Level (coded)	Independent Variables				
	Luminosity (L)	Temperature (T) (°C)	Agitation (A) (rpm)	Strategy for cell culture homogenization (S)	Bacterial isolated type (Kpa)
-1	Light	30	180	Without spiral	FT- 7.22
+1	Dark	40	250	With spiral	FT- 5.12

Each factorial design 2³ was composed of a total of 8 experiments. The “Experimental Design” module of the Statistica 7.0 program [20] was used to analysis the experimental responses, to

determine the effect of the independent variables or the interaction among them on the total carotenoid levels obtained after 48 hours.

Pigment production on a large scale

After determining the best experimental conditions for bioproduction pigment by experimental design technique, we used a benchtop fermenter (New Brunswick Scientific Bioflo 110, Edison New Jersey) with 10 L of culture, kept under orbital shaking, aeration 1.0 vvm, with initial pH 7.0, for 48 hours.

Parameters for conversion calculations

We determined from the supernatants of the cultures in bioreactors both the conversion factors of glucose and nitrogen in the carotenoid production and the glucose conversion factor in cells, among other factors, based on the methodology of Aksu and Eren[21].

Analytical procedures

Cell growth was assessed by quantification of dry cell mass (g/L). Samples were taken at definite time intervals and centrifuged at 14,000 rpm at 15°C for 7 minutes (HERMLE Z383K, Wehingen Alemanha). The harvested cell pellets were washed twice with saline and lyophilized (Terroni/Enterprise II, São Paulo Brazil) at 60°C for 48 hours then the dried cell mass was expressed in terms of concentration (g/L) and the supernatant was removed in order to quantify the remaining substrate.

High performance liquid chromatography (HPLC) was used to quantify the glucose, with RI (refractive index) used for detection (2414 Waters, Rio de Janeiro Brazil) in a monosaccharide column (molecular exclusion, 300 x 7.7 mm) (Agilent Technologies Varian, California USA), with column temperature at 35°C and an ultra-pure water mobile phase at a flow rate of 0.6 ml/min. The total nitrogen was determined by the ninhydrin method according to the methodology of Abernathy et al.[22].

The carotenoids were extracted from the dried biomass according to the method described by Arulselvi et al.[23] and modified by vortexing (Phoenix/AP 56, São Paulo Brazil), ultrasonic bath (Unique/USC 800, São Paulo Brazil) and then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min (HERMLE Z383K, Wehingen Alemanha). Carotenoid concentration was determined spectrophotometrically (Bioespectro SP-220, Paraná Brazil), with absorbance at 450 nm, using the equation[24] with an absorption coefficient $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$ since the type of carotenoids present in the sample was not known[25].

The extract obtained was dried in a rotaevaporator (IKA RV 2, São Paulo Brazil) and the residual material put through a saponification process[26]. The extract was dried again in a rotaevaporator and the residual material was resuspended in methanol. The dye extracted was filtered through a hydrophobic membrane PTFE with 0.45 micrometre (Waters, Milford USA). The composition of the major carotenoids was quantified by High Performance Liquid Chromatography equipped with a UV-Vis detector (2998 Waters, Rio de Janeiro Brazil), using the extracted wavelength chromatogram at peak $\lambda_{\max}$, 450 ± 16 nm for sarcinaxanthin and carotenoids with corresponding UV/Vis profiles. The chromatographic separation was performed in a reversed-phase column (C18 4,6 x 150 mm) (Sunfire Waters, Rio de Janeiro Brazil), column at a temperature of 30°C and was run isocratically for 20 min, with a mobile phase consisting of acetonitrile/methanol/ethyl acetate (10:50:40) at a flow rate of 0.6 ml/min. The peaks were evaluated based on an absorbance of 450 nm. Beta-carotene was used as the external standard (Sigma, São Paulo Brazil).

To confirm the identities of known peaks for quantification and to determine the molecular masses of unknown carotenoids, we used liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) LC-MS ACQUITY UPLC M-Class - SQ Detector 2 (Waters, Rio de Janeiro Brazil). Chromatographic separation was performed in a reversed-phase column (C18 2,1 x 100 mm) (ACQUITY UPLC HSS C18 Waters, Rio de Janeiro Brazil), where the column temperature was maintained at 21.4 °C and the mobile phase consisted of acetonitrile + 0.1% formic acid, methanol + 0.1% formic acid, ethyl acetate + 0.1% formic acid and water + 0.1% formic acid at a flow rate of 0.4 ml/min.

Biological activities

Antioxidant Activity

The antioxidant activity by the combined oxidation of beta-carotene and linoleic acid was determined according to the methods of Rufino et al.[27] and Duarte-Almeida et al.[28].

The extracts were diluted at concentrations from 0.312 to 23.26 mg/ml. All analyses were performed in triplicate and BHT (hydroxytoluene utyl) (Sigma, São Paulo Brazil) was used as the standard.

Photoprotective activity *in vitro*

Methanolic solutions in concentrations of 100 mg/L were prepared in triplicate with the crude extract. Then the absorbance was measured in a spectrophotometer in wavelengths between 290 and

320nm. The values obtained were used to calculate the SPF according to the methodology of Velasco et al.[29].

Results and discussion

16S rDNA sequence analysis

The 16S rDNA of two yellow-colored bacterial isolates (FT-5.12 and FT-7.22), obtained from the Caatinga region of Brazil, was sequenced and identified as *Kocuria palustris*. The sequences amplified by PCR analysis, exhibited for both strains a 99% similarity with known deposited sequences of *Kocuria palustris* in public databases. According to Stackebrandt and Goebel[30] and Gevers et al.[19], sequence similarity of 16S ribosomal values superior to 97% are sufficient to consider conspecificity.

Effect of temperature incubation, luminosity and bacteria *Kocuria palustris* FT-5.12 and FT-7.22 on carotenoid production

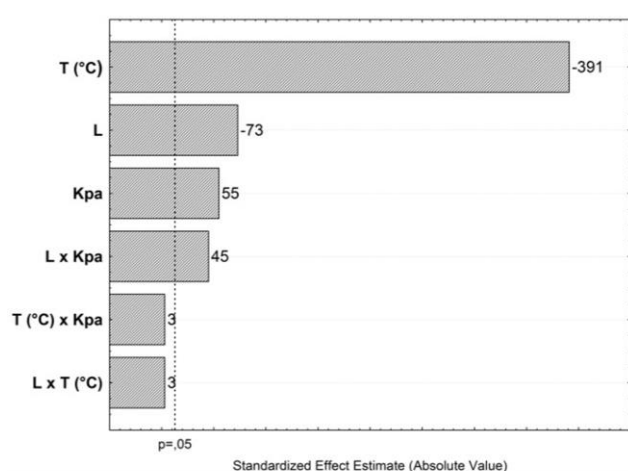
The first factorial design 2^3 was carried out to study the effects of temperature incubation (T), luminosity (L) and bacterial isolates type (Kpa) on the production of carotenoid (Table 2). The results displayed that all the factors considered were different with a significance at 0.05 levels ($p < 0.05$) (Fig. 1).

Table 2 First factorial design 2^3 with coded values and experimental responses obtained after 48 hours of production of *Kocuria palustris* for total carotenoid, specific carotenoid and dry weight biomass

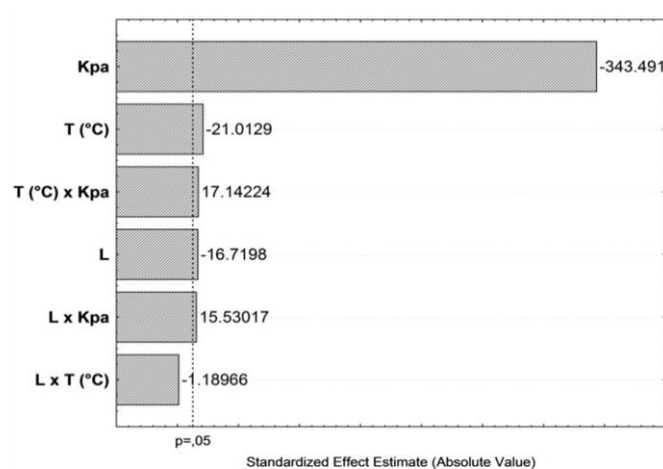
Essay	Independents Variables			Response		
	X ₁ Luminosity (L)	X ₂ Temperature (T) (°C)	X ₃ Bacterial isolated type (Kpa)	Total carotenoids (µg/L)	Specific carotenoids (µg/g)	Dry weight biomass (g/L)
1	-1 (Light)	-1 (30)	-1 (FT 7.22)	1752.00	489.01	3.58
2	+1 (Dark)	-1 (30)	-1 (FT 7.22)	1632.00	454.14	3.59
3	-1 (Light)	+1 (40)	-1 (FT 7.22)	1356.00	447.29	3.03
4	+1 (Dark)	+1 (40)	-1 (FT 7.22)	1240.00	407.34	3.04
5	-1 (Light)	-1 (30)	+1 (FT 5.12)	1760.00	53.82	32.70
6	+1 (Dark)	-1 (30)	+1 (FT 5.12)	1728.00	52.66	32.81
7	-1 (Light)	+1 (40)	+1 (FT 5.12)	1368.00	49.55	27.60
8	+1 (Dark)	+1 (40)	+1 (FT 5.12)	1344.00	47.95	28.03

Considering the individual effect, it is possible to observe that the most relevant variables related to the total carotenoid production were incubation temperature, with a negative effect,

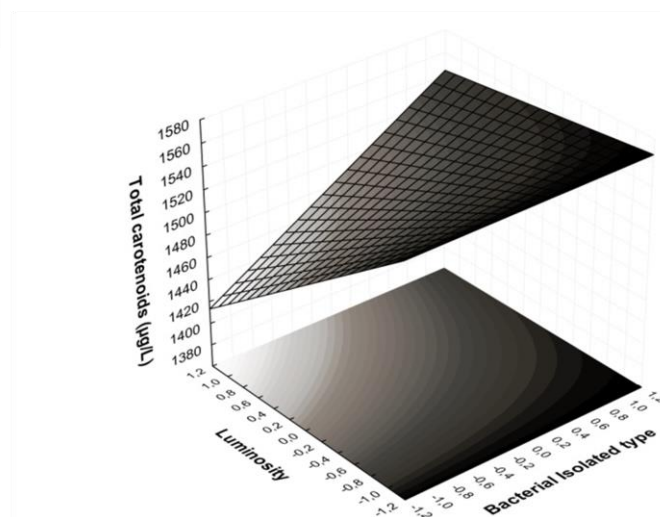
followed by luminosity and type of isolated bacterial used (Fig. 1a). The assays at 30°C showed a carotenoid production (in average 1718 µg/L) of 1.3-fold higher than at 40°C (in average 1327 µg/L). The estimated effect of temperature increase was -391. These data support the characterization studies performed with the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* as well as with a bacterium yellow pigment producer, where it was reported that microorganisms grown at 30°C had positive effects on the formation of carotenoids[31,32]. The total carotenoid production at 30°C was 2.36 times higher than that produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*[14]. Considering this, we concluded that isolated FT-5.12 and FT-7.22 of *Kocuria palustris* are good producers of carotenoids.



(a)



(b)



(c)

Fig. 1 First factorial design 2^3 with the effect of factors of luminosity (L), temperature (T) and bacterial isolated type on carotenoid production. (a) Pareto diagram with the effects of these variables on total carotenoid production (µg/L). (b) Pareto diagram with the effects on specific

carotenoid production ($\mu\text{g/g}$). (c) Response surface of influence of luminosity and bacterial isolated type on total carotenoid production in the factorial design 2^3

The second largest influence was the luminosity (negative effect), where light exposure increased carotenoid production by 4.9%, with the estimated effect of -73. The positive effect of light exposure on carotenoid production possibly occurs due to the properties of photoprotection of the carotenoids. Sakaki et al.[33] suggested that this photoprotection was because of the relation of light to pigment production when using the yeast *Rhodotorula glutinis*.

In addition, relative to bacterial isolate types, the isolate FT-5.12 presented a positive effect on carotenoid production, with an average of 1550 $\mu\text{g/L}$ total carotenoid production. This represents 3.6% more total carotenoid production than FT-5.12 isolate.

Finally, the influence of a combination of factors was also analyzed (Fig. 1c). As expected, the variables of luminosity and isolated type were shown to be positively significant, with an estimated effect of 45. As to the regression coefficients values, it is possible estimate the equation 1 representing the linear model that describes the effect of the variables considered in the total carotenoid production:

$$\text{Total carotenoid production } (\mu\text{g/L}) = 1522.500 - 36.500 L - 195.500 T + 27.500 Kpa + 1.500L T + 22.500L Kpa + 1.5 T Kpa \quad (1)$$

Where L is the luminosity, T is the temperature and Kpa is the bacterial isolate type.

The correlation coefficient (R^2) obtained was 0.99, close to perfect, indicating that the models were 99% accurate. These results indicate reliability between the experimental and values predicted by the models.

The models thus made it possible to generate a superficial response analysis of the influences of the variables on carotenoid production. As Fig. 1c shows, cultivation of isolated FT-5.12 with exposure to light resulted in an increase of total carotenoid production.

A more precise analysis of pigment production, however, revealed a different situation. When considering specific carotenoid production, we observed that in the pigment produced by biomass unity ($\mu\text{g/g}$), the FT-7.22 isolate achieved an average specific carotenoid production of 450 $\mu\text{g/g}$, representing a value of 88% superior than to the FT-5.12 strain (51 $\mu\text{g/g}$). Thus the production of cellular biomass from the isolate FT-5.12 was higher, on average 30.33 g/L, representing a 90% higher biomass production than from the FT-7.22 (3.3 g/L). The analysis of pigment production revealed that there exists an opposite relation between cell growth and the specific carotenoid production evidenced in *Kocuria palustris* isolates. Considering this, and using the results from the specific production of carotenoid, we also performed a statistical analysis to show the most relevant variable for the type of bacterial isolate used, with an estimated effect of -343.49 for FT-7.22 (Fig.

1b). This analysis indicated the FT-7.22 isolate as having the main effect on specific carotenoid production. In terms of carotenoid production, this parameter proved to be more important than that of total carotenoid production, to achieve better yields.

Effect of gas transfer rate and bacteria *Kocuria palustris* FT-5.12 and FT-7.22 on carotenoid production

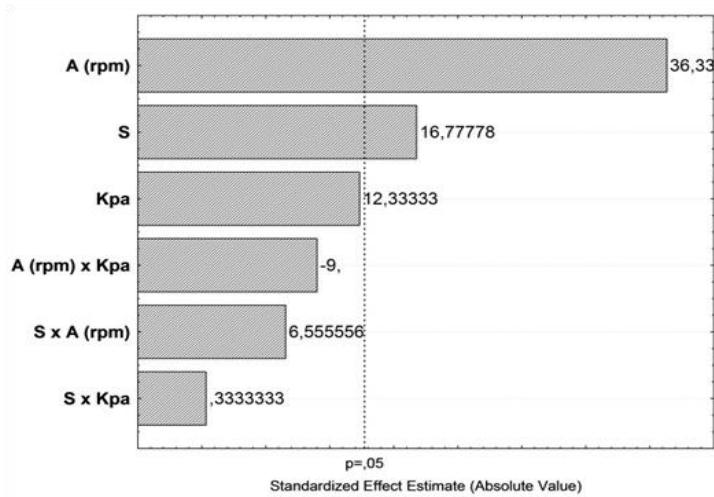
From the results of the first factorial design (isolated bacterial, temperature of 30°C and light incidence), and to further increase the pigment production, we conducted a second 2³ factorial design (Table 3), analyzing this time the gas transfer rate (different agitation speed and absence or presence of spirals in the flask) and the bacterial isolated type.

Table 3 Second factorial design 2³ with values and experimental results obtained from production of *Kocuria palustris* varying the oxygen transfer rate (agitation and absence and presence of spiral filaments in the flask)

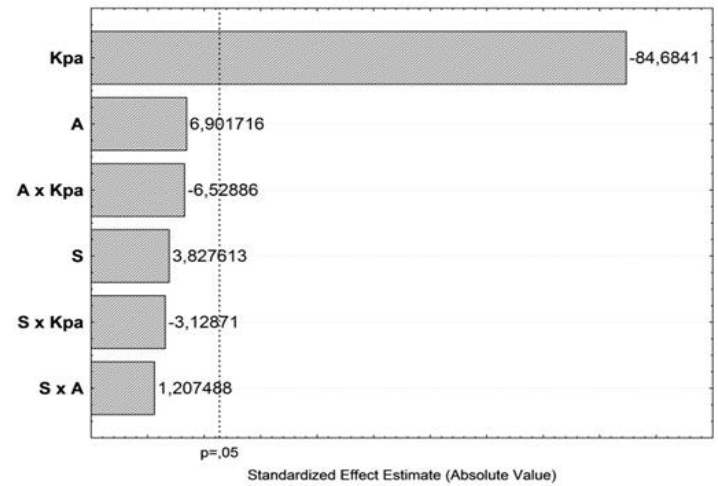
Essay	Independents Variables			Response		
	Strategy for cell culture homogenization (S)	Agitation (A) (rpm)	Bacterial isolated type (Kpa)	Total carotenoids (µg/L)	Specific carotenoids (µg/g)	Dry weight biomass (g/L)
1	-1 (Absence spiral)	-1 (180)	-1 (FT 7.22)	1772.00	556.41	3.18
2	+1 (presence spiral)	-1 (180)	-1 (FT 7.22)	1852.00	586.85	3.15
3	-1 (Absence spiral)	+1 (250)	-1 (FT 7.22)	2112.00	628.35	3.36
4	+1 (presence spiral)	+1 (250)	-1 (FT 7.22)	2328.00	687.09	3.39
5	-1 (Absence spiral)	-1 (180)	+1 (FT 5.12)	2056.00	72.23	28.46
6	+1 (presence spiral)	-1 (180)	+1 (FT 5.12)	1952.00	69.08	28.25
7	-1 (Absence spiral)	+1 (250)	+1 (FT 5.12)	2148.00	70.14	30.62
8	+1 (presence spiral)	+1 (250)	+1 (FT 5.12)	2352.00	75.95	30.96

In this second factorial design, the results were found to be significantly different for total carotenoid production ($p < 0.05$), considering the variables of agitation and the strategic procedure used for cell culture homogenization, with the estimated effect of 36.33 and 16.78 respectively (Fig.2a). Maximum pigment concentration obtained in this second experiment was on average 2340 µg/L for the two isolates, being 1.33-fold higher ($p < 0.01$) than that under the best condition of the previous design. This concentration in our study was 2.31-fold higher than the 1019 µg/L of carotenoid production obtained in an optimization study using *Sporidiobolus salmonicolor*[4]. Again, this comparison shows *Kocuria palustris* as a potential carotenoid producer. At the same time, the results strongly indicate that the highest rate of agitation (250 rpm) in combination with the increment in turbulence through the presence of spirals in the flask positively stimulates total

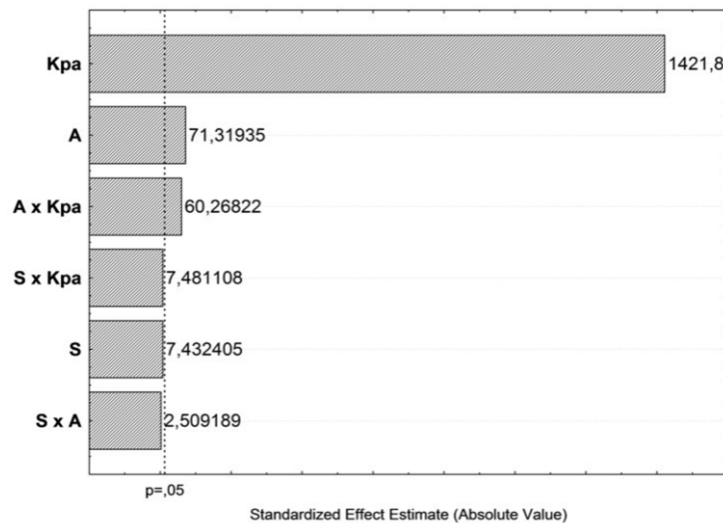
carotenoid synthesis (Fig. 2d). This observation corroborates the results presented by Shatila et al.[34], that the high production of pigments after two days of incubation at 30°C under shaking conditions led them to the conclusion that aeration enhances carotenoid production in *Exiguobacterium aurantiacum*.



(a)



(b)



(c)

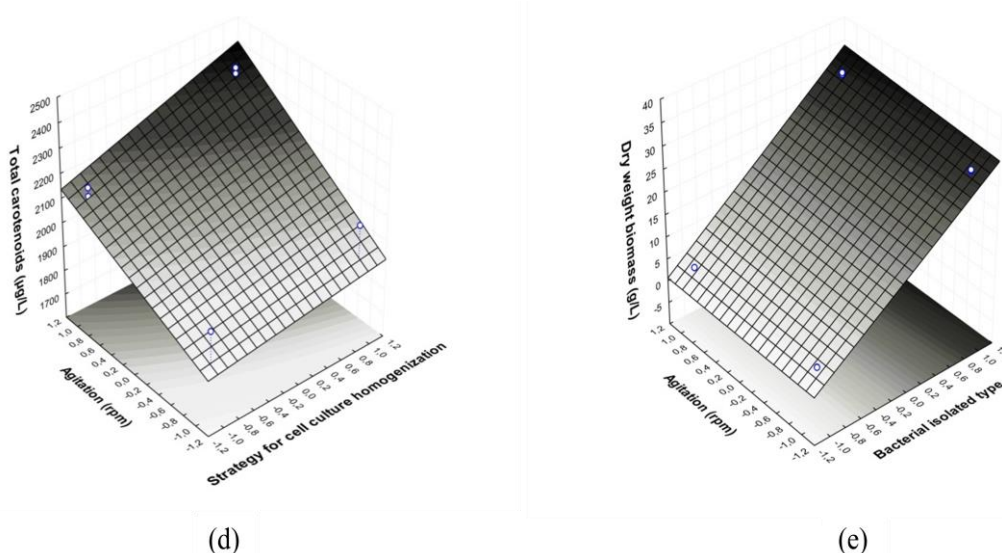


Fig. 2 Second factorial design 23 with the effects of agitation (A), strategy for cell culture homogenization (S), and bacterial isolated type (Kpa) on carotenoid production. (a) Pareto diagram with the effects these variables on total carotenoid production (µg/L). (b) Pareto diagram with the effects on specific production of carotenoids (µg/g). (c) Pareto diagram with the effects on biomass (g/L). (d) Response surface of effect of agitation and strategy for cell culture homogenization on total carotenoid production. (e) Response surface of agitation effect and of bacterial isolated type in the production of dry weight biomass

The data from the second factorial design were employed to generate a mathematical model describing the profile of total carotenoids production at 48 h by cultures of isolates *Kocuria palustris* at 95% confidence. The variables were fitted to a first-order model equation and examined in terms of the goodness of fit (Equation 2). With the values of the regression coefficients, it is possible to estimate the equation representing the linear model describing the influence of variables over the total carotenoid production:

$$\text{Total carotenoid production (}\mu\text{g/L)} = 2071.500 + 75.500 S + 163.500 A + 55.500 Kpa + 29.500 S A + 1.500 S Kpa - 40.500 A Kpa \quad (2)$$

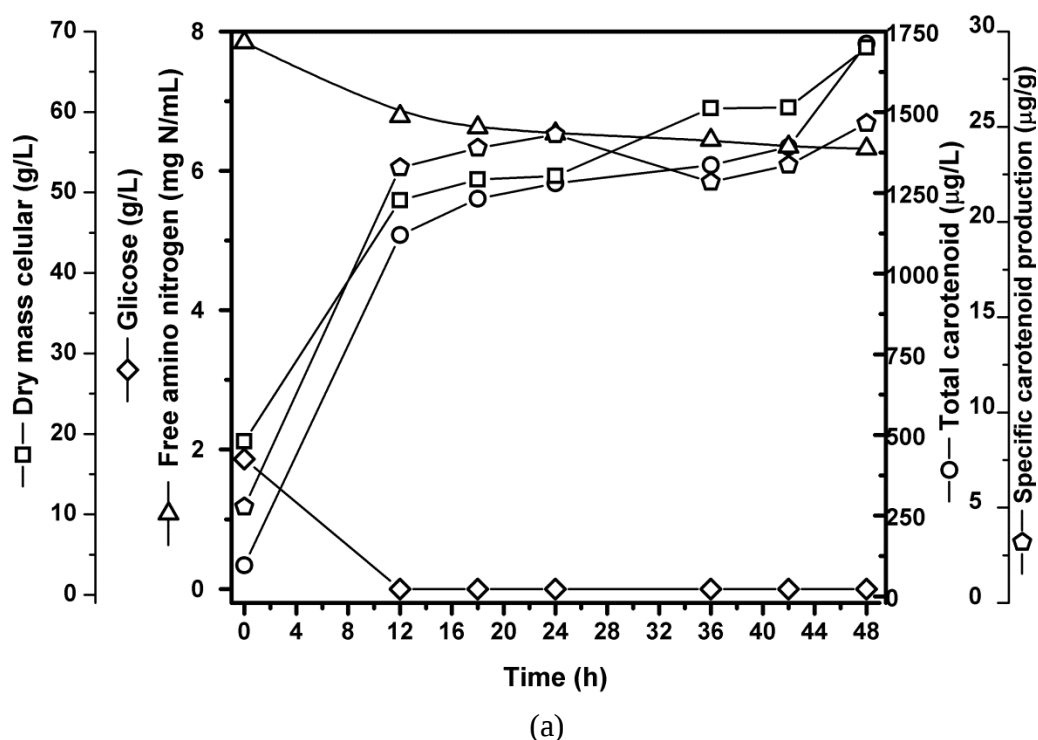
Where S is the strategy homogenization of the cell culture strategy for cell culture homogenization, A is agitation and Kpa is bacterial isolate type. The correlation coefficient (R^2) obtained was 0.99, close to perfect, indicating that the models fit with 99% of accuracy with the results obtained. These results indicate a great consistency between values predicted by the experimental and those predicted by the model. Figure 2d shows that forcing an increase in the gas transfer rate, by orbital agitation and turbulence using spirals, resulted in an evident increment in total carotenoid production.

Comparative analysis of specific carotenoid production by the isolate FT-7.22 shows an 8.5 times higher specific production than FT-5.12, whereas the total production remains similar for both strains. As was identified in the first factorial design, there was an inverse relation between growth and the specific carotenoid production. Similar to the previous experiment, the specific carotenoid production was relatively dissimilar for the isolate of *Kocuria palustris*, being highly dependent of the isolate type used in study (Fig. 2b).

Analysis using biomass as the response indicated that the type of isolated used (estimated effect of 1421.89) and agitation (estimated effect of 71.32) (Fig. 2c) were significant. Kovács et al.[35] reported that *K. palustris* depends on oxygen supply for growth. The results of our study strongly indicated that biomass production depends directly of the isolated type of *K. palustris* used and is influenced by oxygen availability (Fig. 2e). The increase in gas transfer rate increases pigment production and biomass possibly because of the higher oxygen availability.

Pigment production on a large scale

We then tested the optimal variables from the previous experiments of a scaled up process. Cultures (10L) of the bacterial isolates FT-5.12 and FT-7.22, cultivated in a bioreactor in TSB medium, were kept under stirring at 250 rpm, aeration at 1.0 vvm, temperature of 30°C, and with an initial pH 7.0. Fig. 3 shows the kinetics of growth, carotenoid production and substrate consumption (glucose and nitrogen) at 48 h of cultivation.



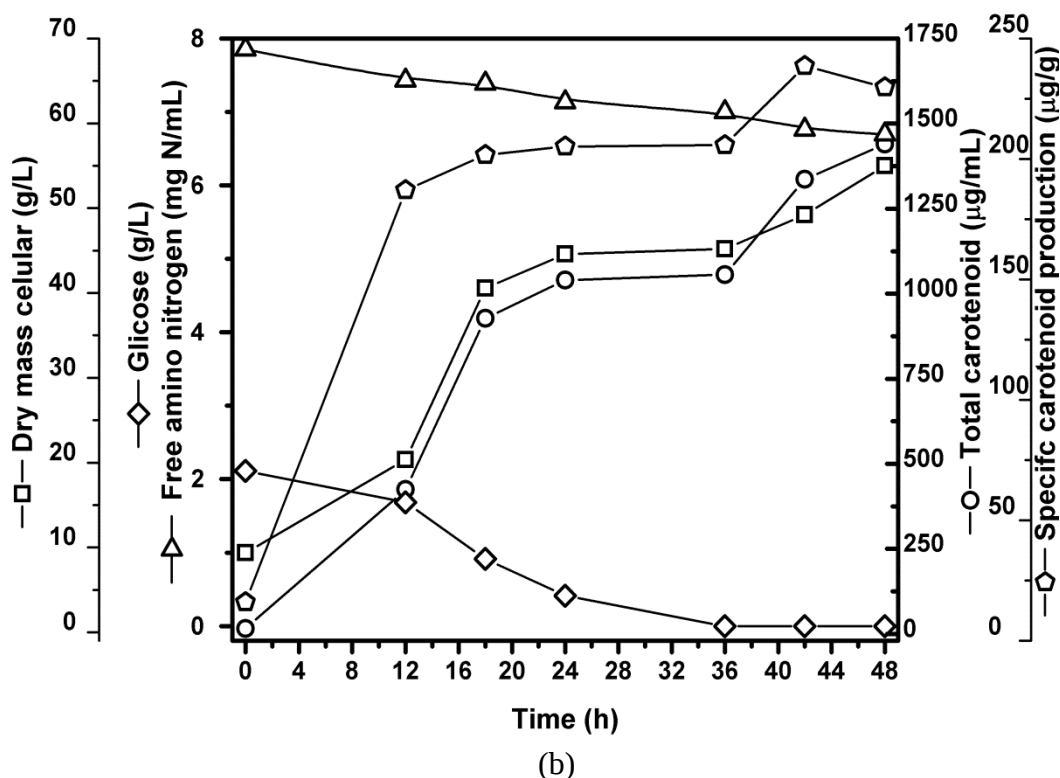


Fig. 3 Total and specific kinetic production of carotenoids in bioreactor by *Kocuria palustris* at optimized conditions (250 rpm, 30°C, light environment, 1.0 vvm, initial pH 7.0 in medium TSB) (a) Isolated FT-5.12 (b) Isolated FT-7.22

It possible to notice that the FT-5.12 isolate exhibited higher cell growth rate than the FT-7.22. This difference was clearly shown by a superior maximum growth rate ($\mu_{\max}$) of 0.4194 h^{-1} for FT-5.12 and 0.3479 h^{-1} for FT-7.22, with isolated FT-5.12 having 11-times more biomass in the final production than the FT-7.22. As expected, the consumption of nitrogen and glucose followed this behavior in relation to the isolate considered. The isolated FT-7.22 consumed all the glucose in the medium in the first 12 h of culture, while the isolated FT-5.12 required 36 h. The nitrogen was not totally consumed for either isolate. However, the isolated FT-7.22 consumed 34.53% more nitrogen than isolated the FT-5.12 at 48 hours. As observed by Orosa et al.[36] in their experiments with *H. pluvialis*, the source of nitrogen does not have much influence on the production of carotenoids.

Carotenoid bioproduction from isolates of *Kocuria palustris* showed an increased rate formation during the first 12-16 hours of culture, with growth declining in a constant mode between 20 and 40 hours, and returning again to grow in the range of 36-42h to 48 h. It seems that the growth and pigment production profile followed an increase in two phases, suggesting a diauxic change starting at 24 h. More studies could be conducted to confirm this observation. The high peak

in total carotenoid production was reached at 48 h, during the stationary phase of isolated growth. This also was observed by Masetto et al.[37] for the highest carotenoid production in a culture of the bacterium *Flavobacterium* sp. (ATCC 21588) in the stationary phase. The maximum number of total carotenoids produced by isolated FT-5.12 and FT-7.22 was 1712 $\mu\text{g/L}$ and 1440 $\mu\text{g/L}$, respectively, and the specific carotenoid production was of FT-7.22 (229.78 $\mu\text{g/g}$) and FT 5.12 (25.17 $\mu\text{g/g}$). The maximum yield of carotenoids (Pp) for the isolate FT-5.12 was 33.66 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ and 29.66 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for FT-7.22 (Table 4).

Table 4 Parameters calculated during the carotenoid production in bioreactor with TSB medium for maximized conditions: 250 rpm, 30°C in light environment, aeration 1.0 vvm initial pH 7.0, 48h bioproduction

Parameter	<i>Kocuria palustris</i> FT-5.12	<i>Kocuria palustris</i> FT-7.22
YP/N ^a ($\mu\text{g/g}$)	1062.41	531.01
YX/N ^b (g/g)	42.20	2.31
YP/S ^c ($\mu\text{g/g}$)	918.45	681.49
YX/S ^d (g/g)	36.48	2.96
YP/X ^e ($\mu\text{g/g}$)	25.17	229.78
Px ^f ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	1.02	0.11
Pp ^g ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	33.66	29.66

^a Nitrogen conversion factor in carotenoid; ^b Nitrogen conversion factor in cells; ^c Glucose conversion factor in carotenoid; ^d Glucose conversion factor in cells; ^e Relationship between the carotenoid production and cells; ^f Yield in cells; ^g Yield in carotenoid.

Identification of carotenoids

Enriched carotenoid extracted from the dry biomass generated after 48 h was 465.2 mg (FT-5.12) and 391.3 mg (FT-7.22). Finally, 23.26 mg/mL of pigment extract was obtained for the FT-5.12 strain, and 19.56 mg/mL for the FT-7.22 strain.

Use of the chromatographic procedure made it possible to separate and identify the major carotenoids produced by *K. palustris* (Fig. 4a). The analysis displayed the presence of a major peak (retention time: 3.75 min) denominated C1, and three minor peaks of RT of 4.21, 4.68, and 8.09 denominated C2, C3 and C4, respectively.

The spectral analysis (sweep 200-600 nm) of these peaks showed that for major peak C1 there were three maximal adsorption values 415.5 nm, 439.7 nm and 468.9 nm (Fig. 4b), which are characteristic of the sarcinaxanthin carotenoid[6]. Presence of C4 as lycopene in a concentration of 2.28mg/L (FT-7.22) and 4.77 mg/L (FT-5.12) was identified. In order to confirm the identity of this

compound, a LC-MS analysis determining the relation between charge/mass in the sarcinaxanthin compound was conducted.

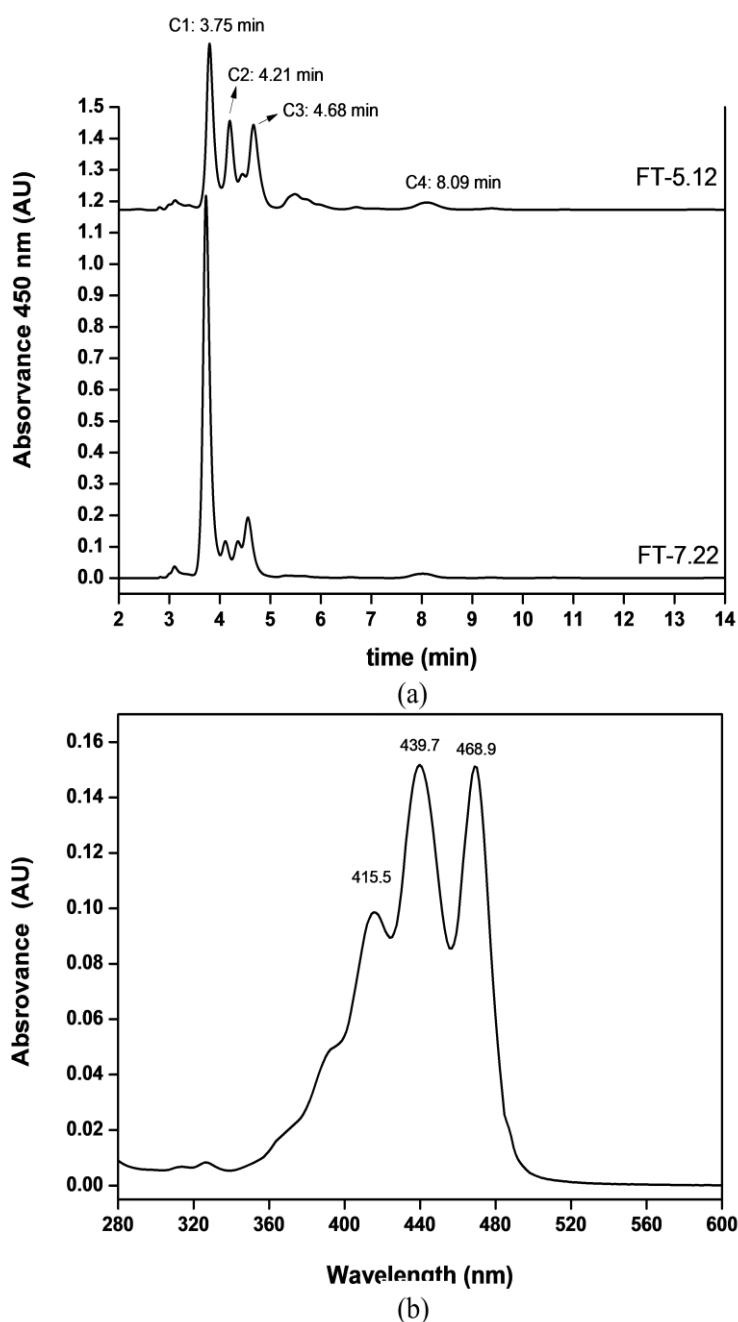


Fig. 4 (a) HPLC elution profiles of the carotenoids extracted from *Kocuria palustris*. (b) Absorption spectra of the major carotenoids from *Kocuria palustris* identified using spectral data

Both maximal spectral absorption and mass spectrometry data suggest that the major compound produced (C1) by the two isolated *Kocuria palustris* is the sarcinaxanthin carotenoid (705 Da), and the minor compounds (C2 e C3) are derivatives of it: sarcinaxanthin diglucoside (1029 Da) and monoglucoside (887 Da), and C4 as lycopene[38,6]. Sarcinaxanthin is a C50 carotenoid that has

been little studied[39]. C50 carotenoids have multiple conjugated double bonds, and they contain at least one hydroxyl group. Both features contribute to strong antioxidative properties[40]. In nature, C50 carotenoids are synthesized by bacteria of the *Actinomycetales* order.

In the case of the bacterial isolate FT-7.22, compound sarcinaxanthin C1 was produced at 112.48 mg/L (2.34 mg/g dry cell mass), while for isolate FT-5.12 production was 50.39 mg/L (0.75 mg/g dry cell mass). The concentration of sarcinaxanthin found in this study, which was the highest produced by *K. palustris* FT-7.22, was similar to the sarcinaxanthin 2.5 mg/g of the dry cell mass-produced by a genetically modified *E. coli*[6].

Sarcinaxanthin production by bioreactor (10L) compared to production in flasks showed that production of the major compound in a bioreactor was approximately 118 times more for FT-5.12 and 165 times more for FT-7.22 increased. This suggests that *K. palustris* FT-7.22 is largest producer of sarcinaxanthin.

These results demonstrate that isolates identified as being *Kocuria palustris* FT-5.12 and FT-7.22, exhibit different characteristics of growth and production of carotenoids. From these data, the existence of a possible intraspecific genetic variability may be analyzed by molecular markers for less conserved regions, for example the sequence analysis of the spacer regions between 16S-23S rDNA genes that have a lower evolutionary pressure and greater genetic variation could be identified as potentially different strains[41].

Biological activities

Antioxidant Activity

The antioxidant activity determination of the extract of total carotenoid extract was analyzed by percentage inhibition in co-oxidation system β -carotene/linoleic acid. The extracts of isolated FT-5.12 and FT-7.22 (23.26 mg/ml and 19.56 mg/ml, respectively) showed the greatest percentages of inhibition, $73 \pm 0.042\%$ and $80.6 \pm 0.21\%$ respectively. Probably this higher rate of antioxidant activity displayed for the isolated FT-7.22 extract occurred because of the presence of a greater quantity of the major compound, carotenoid sarcinaxanthin. The BHT considered as standard showed higher oxidation inhibition activity of β -carotene than the two extracts at different concentrations. Kumar et al.[42] analyzed by the same method a crude extract of *Streptomyces*, reporting a 50% inhibition at a concentration of 0.580 mg/ml. In our work with 0.325 mg/ml of extract FT-7.22 was observed $57 \pm 0.94\%$ inhibition.

Photoprotective activity *in vitro*

After the absorbances in wavelengths 290-320 nm were measured, the results were subjected to a mathematical treatment and SPF values of the extracts were determined. The isolated extract FT-5.12 displayed 4.65 ± 0.83 of SPF and the extract of FT-7.22 a SPF of 6.81 ± 0.64 . The same direct relationship between higher concentration of the sarcinaxanthin major carotenoid and higher rate of biological activity is also observed here in the photoprotective activity of the extract obtained from the isolate FT-722. According to Resolution RDC No. 30 of June 1, 2012, the minimum value of FPS sunscreen should be 6.0[43]. Thus, it is possible suggest that bioactive compounds of the extract FT-7.22 could act in synergy with an organic filter in order to increase the value of the SPF. We conclude that carotenoid pigments can be utilized in photoprotective formulations given their biological properties against the production of reactive oxygen species (ROS) and UV radiation[44]. Suryawanshi et al.[45] evaluated the prodigiosin pigment obtained from the bacterium *Serratia marcescens*, where the isolated pigments were not able to generate any substantial amount of SPF, but the addition of this pigment in SPF values of 15, 24 and 40 of sunscreens resulted in an increase of 20%, 42% and 65%, respectively.

Conclusion

This study identified bacteria isolated from Caatinga FT 5.12 and FT 7.22 as *Kocuria palustris*. Maximum carotenoid production in Erlenmeyer flasks occurred at 30°C, with light, 250 rpm and in presence of spirals. Sarcinaxanthin and derivatives, as well as lycopene, were the major compounds produced. *Kocuria palustris* FT-7.22 generated sarcinaxanthin (112.48 mg/L), with an antioxidant activity of $80.6 (\pm 0.21) \%$ and FPS of $6.81 (\pm 0.64)$. As a potential producer of sarcinaxanthin, this could be exploited by industry, for example cosmetics.

Acknowledgements

The Authors acknowledge financial support from the Coordination for the Improvement of People of Higher Level (CAPES). Also we express our thanks to the Center of Strategic Technologies Northeast (CETENE), for the structure provided for the development this work.

References

1. Maldonado IR, Scamparini AR, Rodriguez-Amaya DB (2007) Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 38 (1):65-70

2. Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research* 43 (3):228-265
3. Kopec RE, Cooperstone JL, Cichon MJ, Schwartz SJ (2012) Analysis methods of carotenoids. *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals* Hoboken: Chichester: Wiley-Blackwell:105-149
4. Valduga E, Tatsch PO, Tiggemann L, Treichel H, Toniazzi G, Zeni J, Di Luccio M, Furigo A (2009) Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quim Nova* 32 (9):2429-2436
5. Heider SA, Peters-Wendisch P, Wendisch VF, Beekwilder J, Brautaset T (2014) Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. *Applied microbiology and biotechnology* 98 (10):4355-4368
6. Netzer R, Stafsnes MH, Andreassen T, Goksøyr A, Bruheim P, Brautaset T (2010) Biosynthetic pathway for γ -cyclic sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: Heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases. *Journal of bacteriology* 192 (21):5688-5699
7. Goksøyr A (2013) Carotenoid sunscreen. Google Patents,
8. Mapari SA, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U (2005) Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology* 16 (2):231-238
9. Zhai Y-G, Han M, Zhang W-G, Qian H (2014) Carotene production from agro-industrial wastes by *Arthrobacter globiformis* in shake-flask culture. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 44 (4):355-369
10. Goswami G, Chaudhuri S, Dutta D (2015) Studies on the stability of a carotenoid produced by a novel isolate using low cost agro-industrial residue and its application in different model systems. *LWT-Food Science and Technology* 63 (1):780-790
11. Kaiser P, Surmann P, Vallentin G, Fuhrmann H (2007) A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. *Journal of microbiological methods* 70 (1):142-149
12. Pezzoni M, Costa CS, Pizarro RA, Oppezzo OJ (2011) The relationship between carotenoids and sunlight response in members of the family Micrococcaceae. *Journal of basic microbiology* 51 (3):325-329
13. Mandelli F, Yamashita F, Pereira JL, Mercadante AZ (2012) Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (1):126-134

14. Maldonade IR, Rodriguez-Amaya DB, Scamparini AR (2012) Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (1):109-115
15. Oliveira R (2007) Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano. MSc Dissertation, Univ. Estadual de Feira de Santana.(Unpublished).[Links],
16. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173 (2):697-703
17. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215 (3):403-410
18. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25 (17):3389-3402
19. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3 (9):733-739
20. INC SS (2004) Statistica (data analysis software system) version 7.
21. Aksu Z, Eren AT (2007) Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical engineering journal* 35 (2):107-113
22. Abernathy DG, Spedding G, Starcher B (2009) Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. *Journal of the Institute of Brewing* 115 (2):122-127
23. Arulselvi I, Sasidharan P, Raja R, Karthik C, Gurumayum RS (2013) Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps. *Journal of Biochemical Technology* 4 (4):632-635
24. Davies B (1976) Carotenoids. In" *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*"(TW Goodwin, ed.) pp 38-165. Academic Press, London,
25. Britton G (1984) General carotenoid methods. *Methods in enzymology* 111:113-149
26. Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ (2007) Review: Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (7):638-649
27. Rufino M, Alves R, de Brito E, Mancini Filho J, Moreira A (2006) Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema beta-caroteno/ácido linoléico. Embrapa Agroindústria Tropical Comunicado técnico

28. Duarte-Almeida JM, Santos RD, Genovese MI, Lajolo FM (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26 (2):446-452
29. Velasco MVR, Balogh TS, Pedriali CA, Sarruf FD, Pinto CASD, Kaneko T, Baby AR (2011) Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro)—revisão. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 32 (1):27-34
30. Stackebrandt E, Goebel B (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44 (4):846-849
31. Aksu Z, Eren AT (2005) Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* 40 (9):2985-2991
32. Goswami G, Chaudhuri S, Dutta D (2010) Effect of pH and temperature on pigment production from an isolated bacterium. *Chemical Engineer Trans* 20:127-132
33. Sakaki H, Nakanishi T, Tada A, Miki W, Komemushi S (2001) Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *Journal of bioscience and bioengineering* 92 (3):294-297
34. Shatila F, Yusef H, Holail H (2013) Pigment production by *Exiguobacterium aurantiacum* FH, a novel Lebanese strain. *International journal of current Microbiology and Applied science* 2:176-191
35. Kovács G, Burghardt J, Pradella S, Schumann P, Stackebrandt E, Máriaiget K (1999) *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49 (1):167-173
36. Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 96 (3):373-378
37. Masetto A, Flores-Cotera LB, Díaz C, Langley E, Sanchez S (2001) Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. *Journal of bioscience and bioengineering* 92 (1):55-58
38. Handbook C (2004) G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander. Birkhäuser, Basel,
39. Tobias AV, Arnold FH (2006) Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: a model for diversification of natural product pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761 (2):235-246
40. Naguib YM (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of agricultural and food chemistry* 48 (4):1150-1154

41. Gürtler V, Stanisich VA (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142 (1):3-16
42. Kumar PS, Al-Dhabi NA, Duraipandiyan V, Balachandran C, Kumar PP, Ignacimuthu S (2014) In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. *BMC microbiology* 14 (1):1
43. Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. (2012). *Diário oficial da União*
44. Stafsnes MH, Josefsen KD, Kildahl-Andersen G, Valla S, Ellingsen TE, Bruheim P (2010) Isolation and characterization of marine pigmented bacteria from Norwegian coastal waters and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties. *The Journal of Microbiology* 48 (1):16-23
45. Suryawanshi R, Patil C, Borase H, Narkhede C, Stevenson A, Hallsworth J, Patil S (2015) Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. *International journal of cosmetic science* 37 (1):98-107

5 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

- Através da amplificação por PCR do gene ribossomal 16S rDNA, os dois isolados foram identificados como *Kocuria palustris*;
- Os ensaios de planejamentos fatoriais utilizando ferramentas estatísticas para a otimização da produção de carotenoides revelaram como melhores condições: a temperatura de 30°C de incubação, em ambiente com luz, a uma agitação de 250 rpm e a presença de espirais no interior de frascos erlenmeyers;
- Nos dois planejamentos fatoriais realizados observou-se que existe uma relação oposta entre o crescimento celular e a produção específica de carotenoides, que é evidenciada pelos ensaios com o tipo de isolado utilizado de *Kocuria palustris*;
- Observou-se que a concentração máxima de pigmento obtido no segundo planejamento fatorial foi 1,33 vezes significativamente maior ($P < 0,01$) que na melhor condição do primeiro planejamento;
- Os resultados aqui apresentados indicam que o aumento da taxa de transferência de gás aumenta a produção de pigmentos e de biomassa, possivelmente pela maior disponibilidade de oxigênio. E que a produção de biomassa também depende diretamente do tipo isolado selecionado de *K. palustris*;
- A produção de carotenoides pelos isolados de *Kocuria palustris* em biorreator mostrou um aumento na taxa de formação durante as primeiras 12-16 horas de cultura, declinando em um modo constante entre 20 a 40 horas, voltando a crescer novamente em 36-42h a 48 h;
- O perfil de crescimento e produção de pigmentos segue um aumento em duas fases, sugerindo uma mudança diáuxica a partir de 24 h. Porém, mais estudos podem ser realizados para confirmar essa observação;
- A taxa máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) para *Kocuria palustris* FT-5.12 foi de $0,4194 \text{ h}^{-1}$ e $0,3479 \text{ h}^{-1}$ para *K. palustris* FT-7.22, em que o isolado FT-5.12 exibiu produção de biomassa final 11 vezes maior que FT-7.22;
- O pico elevado na produção de carotenoides foi alcançado às 48 h, durante a fase estacionária de crescimento dos isolados;
- O máximo de produção total de carotenoides por *K. palustris* FT-5.12 e FT-7.22 foi $1712 \mu\text{g/L}$ e $1440 \mu\text{g/L}$, respectivamente, já a produção específica de carotenoides foi de $25,17$

$\mu\text{g/g}$ para FT-5.12 e 229,78 $\mu\text{g/g}$ para FT-7.22. O rendimento máximo de carotenoides (P_p) para o isolado FT-5.12 foi 33,66 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 29,66 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para FT-7.22.

- *K. palustris* FT-7.22 se destacou na produção do carotenoide sarcinaxantina com uma concentração de 112,48 mg/L, já *K. palustris* FT-5.12 sintetizou 50,39 mg/L de sarcinaxantina.
- A produção do carotenoide majoritário sarcinaxantina em biorreator de 10 L foi de aproximadamente 118 vezes superior para o isolado FT-5.12 e 165 vezes maior para FT-7.22 que nas produções em erlenmeyers;
- O consumo de nitrogênio e glicose durante a produção seguiu o comportamento em relação ao tipo de isolado considerado. O isolado de FT-7-22 consumiu toda a glicose nas primeiras 12 h de cultura, enquanto o isolado FT-5.12 consumiu em 36 h. O nitrogênio não foi totalmente consumido para ambos os isolados. No entanto, o isolado FT-7.22 consumiu 34,53% mais nitrogênio que FT-5.12 durante as 48 horas.
- A análise das atividades biológicas mostrou taxas de atividade antioxidante contra a oxidação do ácido linoleico de $80,6 \pm 0,21\%$ para o extrato de carotenoide obtido do isolado FT-7.22 e $73 \pm 0,042\%$ para o extrato do isolado FT-5.12.
- Para a avaliação como fotoprotetor o extrato obtido do isolado FT-7.22 apresentou um FPS de $6,81 \pm 0,64$ e o extrato de FT-5.12 mostrou um FPS de $4,65 \pm 0,83$.
- Pode-se sugerir que as altas atividades biológicas apresentadas pelo extrato obtido de *K. palustris* FT-7.22, se deve a elevada concentração do carotenoide majoritário sarcinaxantina (112,48 mg/L) produzida por esse isolado;
- Apesar de pertencerem à mesma espécie, os isolados apresentaram diferentes comportamentos de crescimento, produção de carotenoides e diferentes valores de atividades biológicas;
- A partir dessas diferenças entre FT-7.22 e FT-5.12 de *Kocuria palustris*, sugerem-se estudos posteriores com aplicação de marcadores filogenéticos menos conservados a fim de analisar a variabilidade genética das linhagens de *K. palustris*, possibilitando um melhor conhecimento da diversidade dessa bactéria;
- A análise em HPLC mostrou a presença de um pico majoritário (tempo de retenção: 3,75 min) denominado C1 e três compostos C2, C3 e C4 com tempos de retenção de 4,21, 4,68 e 8,09 min, respectivamente. Em que o pico majoritário (C1) apresentou três valores de adsorção máxima 415,5 nm, 439,7 nm e 468,9 nm característicos de carotenoide sarcinaxantina;

- Com os dados de espectrometria de massa, o composto majoritário produzido pelos dois isolados de *Kocuria palustris* foi confirmado como carotenoide sarcinaxantina (705 Da), os outros compostos minoritários (C2 e C3) foram identificados como seus derivados sarcinaxantina diglicosilada (1029 Da) e monoglicosilada (887 Da), e o C4 foi identificado como licopeno (536,6 Da);
- A partir desses dados pode-se sugerir que *Kocuria palustris* FT-7.22 é um potencial produtor de sarcinaxantina, um carotenoide raro de 50 carbonos, que demonstra significativas atividades biológicas. Dessa forma, essa espécie pode ser explorada como fonte de carotenoide sarcinaxantina por vários setores industriais, em especial o setor de cosméticos.

ANEXO I - Normas da revista: Bioprocess and Biosystems Engineering

Instructions for Authors

GENERAL INFORMATION

Help as many readers find your article as possible!

Your title, abstract and selection of keywords will influence how easy it is for readers to find your work through search engines like Google. In order to increase the visibility of your article, please follow these guidelines:

Title: Make the title descriptive but as short as possible, on average only the first 55 characters (including spaces) will be shown in a Google search. So use the most important words at the beginning of your title. Try to get as many keywords into your title as possible. Avoid jargon (highly technical words), abbreviations and acronyms unless they are well established in the field.

Keywords: think about which words your readers would put into a search engine to find your article. What is the main topic of the article? Select 24 keywords that best describe your article's content.

Headings: Make these descriptive but as short as possible, like the title of your article. The headings should describe the section or paragraph and these help search engines.

Your Abstract:

Please note that the initial decision about whether or not to accept your paper into Bioprocess and Biosystems Engineering will be made on the basis of your abstract only. Your abstract should be able to stand alone and give an accurate summary of your research and the conclusions reached.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The email address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16digit

ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

➤ The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.

Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.

- Use a normal, plain font (e.g., 10pointTimes Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or Math Type for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. LaTeX macro package (zip, 182 kB).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data).Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments and Funding Information

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the

funding information in a separate step of the submission process in the peer review system. Funder names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the funding institution you need is not listed, it can be entered as free text. Funding information will be published as searchable metadata for the accepted article, whereas acknowledgements are published within the paper.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown

Quantities Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative).

Bold for vectors, tensors, and matrices.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [13, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

➤ Journal article

Nugen S, Baeumner HJ (2008) Trends and opportunities in food pathogen detection. *Anal Bioanal Chem* 391:451454

orNugen S, Baeumner HJ (2008) *Anal Bioanal Chem* 391:451454

➤ Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. Doi:10.1007/s001090000086

➤ Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

➤ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York

➤ Online document

Health wise Knowledgebase (1998) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [ISSN.org](http://www.issn.org) LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in text citations and reference list. EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make aerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final size dart work, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8pttype on an axis and 20pttype for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text to speech software or a text to Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and email address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavor. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the network concerns an expansion of previous work (please provide transparency on there use of material to avoid the hint of text recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your
- Conclusions.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all coauthors, as well as from the responsible authorities tacitly or explicitly at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors at revision stage may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor in Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is maintained on the platform, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or nonfinancial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline.

Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to inaccurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

➤ Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (nonfinancial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH DATA POLICY

A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for noncommercial purposes, without breaching participant confidentiality.

The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories for all types of research data such as fig share and Dryad may be used where appropriate.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by Data Cite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

Data Cite

Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community endorsed, public repository is mandatory. Persistent identifiers (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper.

For more information:

Research Data Policy Frequently Asked Questions

Data availability

The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate.

Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

1. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
2. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
3. The datasets during and/or analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.
4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study
5. All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available:

Data availability statements

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

ANEXO II - Comprovação da submissão do artigo**Submitted to**

Bioprocess and Biosystems Engineering

Manuscript ID

BPBSE170233

Title

Optimization of the carotenoid production by *Kocuria palustris* from Brazilian Caatinga region and analysis of biological activities

Authors

Mendes Silva, Tayane

Souza, Raquel

Lucena, Brígida

Vidal, Esteban

Silva, Márcia

Date Submitted

26Apr2017