

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Câmpus de Botucatu

**Obtenção e caracterização de complexos multibioativos obtidos a partir de
resíduo e subproduto visando aplicação como aditivos na piscicultura**

ANDRESSA GENEZINI DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos requisitos
para obtenção ao título de Mestre

Botucatu - SP

Agosto - 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Câmpus de Botucatu

**Obtenção e caracterização de complexos multibioativos obtidos a partir de
resíduo e subproduto visando aplicação como aditivos na piscicultura**

ANDRESSA GENEZINI DOS SANTOS
Zootecnista

ORIENTADORA: Prof^a. Ass. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri
COORIENTADORA: Prof^a. Ass. Dr^a. Margarida Maria Barros

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos requisitos
para obtenção ao título de Mestre

Botucatu - SP
Agosto – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Andressa Genezini dos.

Obtenção e caracterização de complexos multibioativos obtidos a partir de resíduo e subproduto visando aplicação como aditivos na piscicultura / Andressa Genezini dos Santos. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Coorientador: Margarida Maria Barros

Capes: 50403001

1. Pesqueiros. 2. Antioxidantes. 3. Subprodutos.
4. Enzimas. 5. Fermentação em estado sólido.

Palavras-chave: Antioxidantes; Enzimas; Fermentação em estado sólido; Produção animal.

Biografia

Andressa Genezini dos Santos filha de Luzia Aparecida Genezini dos Santos e Aderson Pereira dos Santos, natural do município de Três Lagoas, no estado do Mato Grosso do Sul, nascida no dia 23 de fevereiro de 1996.

Ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal da Grande Dourados, em 2014, concluindo em dezembro de 2018 e colando grau em março de 2019.

Nesse mesmo ano ingressou no mestrado em Zootecnia, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço minha orientadora prof^a. Dr^a. Luciana Francisco Fleuri por me acolher em seu grupo de pesquisa, por me receber de braços abertos no LLL (Laboratório Lindo da Lu), por toda ajuda, incentivo, conhecimento e conselhos ao longo do meu mestrado, minha eterna gratidão!

À minha família por todo apoio ao longo desses anos, em todas minhas decisões. Aos meus pais Luzia e Aderson, aos meus irmãos Wilson e Dirceu, ao meu avô Dirceu e as minhas avós *in memoriam* Maria e Neuza.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LLL, Dafne, Milene, Mirella, João, Meliane e Paulo, por toda ajuda, por todas conversas e risadas.

À minha coorientadora prof^a. Dr^a. Margarida Maria Barros e a todos os meninos do Laboratório Aquanutri William, Igor, Matheus, Edgar, Paulo e Pedro, por toda ajuda e conversas.

Aos meus amigos da Pós-Graduação por todo companheirismo: Gianni (Mascotinha), Rafael (Evangelho), Natalia (Soxo), Andrey, Renata e Janaina.

Aos meus amigos que fiz durante minha estadia em Botucatu: Welen, Ricardo (Jolie), Ricardo, Sarah, Giovani e Ana Paula.

Aos meus amigos de Dourados que fiz durante minha graduação, por sempre acreditarem e torcerem por mim: Kennedy, Brenda, Carolina, Vanessa, Giovana, Gleidson, Gislaine, Rafael e Guilherme.

Aos meus amigos de Três Lagoas por me apoiarem e pela amizade mesmo na distância: Lorryne, Luana (Negona), Cristhian, Adilson (Judeu), Alex, Otávio, Bruna e Patrick.

À Pós-Graduação em Zootecnia, aos coordenadores e todos os funcionários por toda recepção e auxílio sempre que necessário.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, pela infraestrutura fornecida, em especial o Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, por todo aporte físico e técnico.

Meus agradecimentos ao Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular coordenado pelo Prof. Dr. Willian Zambuzzi, e em especial ao Célio Fernandes e Anderson Gomes pela parceria e apoio.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa fornecida durante o meu mestrado, processo nº 133266/2019-2.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	vii
Preâmbulo	viii
Capítulo I: Revisão de Literatura	9
1. Fermentação em Estado Sólido (FES).....	10
2. Resíduos da Laranja.....	10
3. Grãos Secos de Destilaria com Solúveis (DDGS) de Milho	12
4. Proteínas	12
5. Enzimas.....	13
5.1. Lipases.....	13
5.2. Proteases.....	14
5.3. Amilases	15
5.4. Fitase	16
6. Compostos Antioxidantes	17
7. Citotoxicidade	17
Referências Bibliográficas	18
Capítulo II: Obtenção e caracterização de complexos multibioativos obtidos a partir de resíduo e subproduto visando aplicação como aditivos na piscicultura	26
1. Introdução.....	28
2. Objetivo Geral.....	29
2.1. Objetivos Específicos	29
3. Material e Métodos	30
3.1. Fungos e Resíduos	30
3.2. Fermentação em estado sólido (FES)	30
3.3. Determinação das atividades enzimáticas.....	31
3.3.1. Lipase.....	31
3.3.2. Protease	31
3.3.3. Amilase.....	32
3.3.4. Fitase.....	32
3.4. Proteínas Solúveis Totais.....	32
3.5. Aminoácidos Aromáticos.....	33
3.6. Atividade Antioxidante	33
3.6.1. Atividade antioxidante utilizando DPPH	33
3.6.2. Atividade antioxidante pela determinação da Superóxido Dismutase (SOD)	33
3.7. Caracterização dos CMb selecionados	34
3.7.2. Caracterização químico-bromatológica.....	35

3.7.3. Citotoxicidade	35
3.8. Análise estatística	35
4. Resultados.....	36
5. Discussão	38
6. Conclusões.....	41
7. Perspectivas	42
Referências Bibliográficas	43

Lista de Figuras

Figura 1. Canvas da Pesquisa intitulada “Obtenção de complexos multibioativos a partir de resíduo e subproduto e caracterização visando aplicação como aditivos na piscicultura”	49
Figura 2. Representação ilustrativa do delineamento experimental do Complexo Multibioativo (CMB). R1 – repetição 1; R2 – repetição 2; R3 – repetição 3.....	50
Figura 3. Influência do pH e temperatura nas atividades de lipases, determinadas em p-nitrofenil-palmitato, dos Complexos Multibioativos (CMB) fermentados por <i>Aspergillus niger</i> em frit de laranja (a e b, respectivamente) e DDGS de milho (c e d, respectivamente)	54
Figura 4. Influência do pH e temperatura nas atividades de proteases dos Complexos Multibioativos (CMB) fermentados por <i>Aspergillus niger</i> em frit de laranja (a e b, respectivamente) e DDGS de milho (c e d, respectivamente)	55
Figura 5. Influência do pH e temperatura nas atividades de fitases dos Complexos Multibioativos (CMB) fermentados por <i>Aspergillus niger</i> em frit de laranja (a e b, respectivamente) e DDGS de milho (c e d, respectivamente)	56
Figura 6. Viabilidade da célula NIH-3T3 em teste com os Complexos Multibioativos (CMB) fermentados por <i>Aspergillus niger</i> em frit de laranja (a) e DDGS de milho (b).....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atividades biológicas e quantificação de biomoléculas dos Complexos multibioativos (CMB) isolados e fermentados.....	51
Tabela 2. Atividades biológicas e quantificação de biomoléculas dos Complexos Multibioativos (CMB) fermentados por <i>Aspergillus niger</i> em frit de laranja e DDGS de milho, selecionados e produzidos em massa.....	52
Tabela 3. Caracterização bromatológica dos Complexos Multibioativos (CMB) fermentados por <i>Aspergillus niger</i> em frit de laranja e DDGS de milho. As siglas MS – Matéria Seca; PB – Proteína Bruta; EE – Extrato Etéreo; MM – Matéria Mineral ou Cinzas; FB – Fibra Bruta; FDN - Fibra de Detergente Neutro; FDA – Fibra de Detergente Ácida.....	53

Preâmbulo

A dissertação trata da obtenção de complexos multibioativos contendo atividades enzimáticas, conteúdo proteico e antioxidante, caracterizado bioquimicamente, químico-bromatologicamente e quanto à citotoxicidade. Os complexos consistem em resíduos de laranja e de milho isolados e fermentados em estado sólido com fungos, inferindo um processo custo-efetivo com impacto socioambiental e inovador quanto à produção de alimentos alternativos para a piscicultura.

Este documento foi organizado em dois capítulos, sendo o primeiro referente à uma revisão da literatura sobre os principais assuntos do tema, e o segundo referente à parte experimental com resultados e discussão.

Além disso, é apresentado o Canvas da Pesquisa (Figura 1) - ferramenta ilustrativa e informativa da ciência desenvolvida.

Capítulo I: Revisão de Literatura

Resumo: Os resíduos e subprodutos da agroindústria, devido a sua imensa disponibilidade após o processamento da matéria-prima, podem ser utilizados de forma isolada ou como substratos para a fermentação em estado sólido para várias finalidades - como na produção de complexos bioativos para aplicação na alimentação animal, constituindo uma forma sustentável de reaproveitamento de resíduos e subprodutos e contribuindo para redução de custos de produção. Os complexos bioativos, podem conter enzimas, proteínas, antioxidantes, entre outros compostos. Na produção animal a ração é o que mais gera gastos, por isso, o uso de alimentos alternativos cresce cada vez mais. No entanto, existem fatores que podem interferir na digestibilidade e disponibilidade de certos nutrientes nas dietas, o que pode afetar o desempenho e a saúde do animal, sendo uma alternativa a utilização dos complexos bioativos, melhorando em vários aspectos requeridos na piscicultura.

Palavras-chave: antioxidantes, enzimas, fermentação em estado sólido, produção animal.

Abstract: Agroindustry residues and by-products, due to their immense availability after raw material processing, can be used alone or as substrates for solid state fermentation for various purposes - such as in the production of bioactive complexes for application in animal feed, constituting a sustainable way of reusing waste and by-products and contributing to the reduction of production costs. Bioactive complexes may contain enzymes, proteins, antioxidants, among other compounds. In animal production, feed is what generates the most expenses, therefore, the use of alternative foods grows more and more. However, there are factors that can interfere with the digestibility and availability of certain nutrients in the diets, which can affect the performance and health of the animal, being an alternative the use of bioactive complexes, improving in several aspects required in pisciculture.

Keywords: antioxidants, enzymes, solid state fermentation, animal production.

1. Fermentação em Estado Sólido (FES)

A sigla FES originou-se da tradução do inglês “solid state fermentation” ou “solid state culture” pode ser definida como o crescimento de micro-organismos em estado sólido na ausência de fase aquosa livre, sendo o líquido absorvido num suporte sólido ou complexado no interior de uma matriz sólida (Holker et al., 2004; Ghorai et al., 2009; Rosa et al., 2011), fornecendo nutrientes aos micro-organismos ou suporte que impregna estes nutrientes para o desenvolvimento adequado dos mesmos (Pandey, 2003).

Os principais micro-organismos utilizados em FES são fungos filamentosos, pois se assemelham ao ambiente natural de desenvolvimento destes (Hölker et al., 2005; Castro et al., 2015; Hansen et al., 2015), os quais são propensos à colonização em matriz sólida porosa (Oriol, 1987), podendo se desenvolver com umidade que pode variar de 12 a 80% (Lonsane et al., 1985). A água na FES permite a difusão de gases, solutos e metabólitos, implicando na absorção celular, sendo, portanto, um dos fatores relevantes nessa fermentação (Lonsane et al., 1985; Pandey, 2003).

Os processos fermentativos vêm sendo utilizados desde 3.000 a.C., para as produções de alimentos como queijos, pães e, de bebidas como vinho, cerveja e cachaça (Araújo, 2004). Com o passar dos tempos a evolução tecnológica fez com que FES fosse aventada como alternativa nas indústrias farmacêuticas, bioquímicas e na agricultura (Robinson e Nigam, 2003). Destacam-se a partir desse processo as enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, enriquecimento proteico de alimentos fermentados e pré-digestão de rações animais (Amorim, 2011).

No Brasil desde 1986 a FES vem sendo investigada para dar um destino aos resíduos e subprodutos agrícolas que são gerados (Soccol e Vanderberghe, 2003) com viés socioeconômico vantajoso, em especial pela utilização dos que são provenientes da agroindústria (Palma, 2003) e simplicidade e rentabilidade do bioprocesso (Fleuri et al., 2013). Dentre esses resíduos e subprodutos serão destacados os de laranja e os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) de milho, os quais foram utilizados na presente pesquisa.

2. Resíduos da Laranja

A produção de laranja brasileira atingiu 17,6 milhões de toneladas no ano de 2019 (IBGE, 2020), sendo que São Paulo é o estado com maior contribuição, representando aproximadamente 77,5% de toda produção do país, em torno de 13,7 milhões de toneladas (IBGE, 2020).

A laranja é considerada a fruta cítrica mais produzida em todo mundo, quase metade de sua produção é destinada ao processamento industrial (Faostat, 2017; Satari e Karimi, 2018). Nesse processamento, mais especificamente na produção de sucos, aproveita-se no máximo 50% da fruta como um todo (Vilas Boas et al., 2001).

O resíduo gerado pode ser utilizado com um simples tratamento para rações de animais ou adubo para o solo (Zema et al., 2018), além de ser ambientalmente sustentável e econômico (Carvalho, 1992; Pelizer et al., 2007). A reutilização pode trazer o custo-benefício não só para a indústria, mas também para as fábricas de rações, barateando e trazendo alguns nutrientes necessários que complementam a dieta dos animais (Anselmo, 2008).

Na obtenção de sucos de laranja as extratoras utilizadas na indústria separam os resíduos em frações que são denominados casca, frit, bagaço ou polpa. A fração denominada de frit corresponde ao fragmento da casca, sendo a parte mais externa dessa porção (Okino-Delgado e Fleuri, 2016) e tem sido considerada a mais promissora em diversos estudos para obtenção de compostos bioativos (Okino-Delgado et al., 2018; Athanazio-Heliodoro et al., 2018; Okino et al., 2018; Vicente et al., 2019).

No Brasil as variedades de laranjas mais consumidas são Bahia, Hamlin, Natal, Pêra, Rubi, Valência e Westin (CITRUSBR, 2020). Segundo a Embrapa (2013) a laranja da variedade Pêra é a mais utilizada pois, é a mais consumida pelas suas características organolépticas (sabor, aroma e cor), o que atrai mais os consumidores. Na literatura existem alguns trabalhos dos quais geraram resultados quanto à obtenção de biomoléculas utilizando os resíduos da extração do suco com esta variedade (Okino-Delgado e Fleuri, 2014; Pereira, 2017; Francisco et al., 2018).

Lazzari et al. (2015) utilizaram diversos resíduos de frutas, dentre eles a laranja, na composição da dieta de piavas (*Leporinus obtusidens*), demonstrando ser fonte alternativa de alimento. Doan et al. (2018) utilizaram a casca da laranja na alimentação de tilápias-do-Nilo com a intenção de aumentar a imunidade desses animais, sendo recomendado como aditivo funcional nas rações destes animais. Vicente et al. (2019) utilizaram o frit da laranja na dieta de tilápia-do-Nilo, com o nível de suplementação de 0,63 a 0,68% tendo como resposta uma melhora na capacidade antioxidante, mantendo o perfil hematológico, sob os desafios de estresse térmico e de oxigênio dissolvido.

Além de serem resíduos considerados fontes diretas de biomoléculas interessantes, podem também ser utilizadas como substratos para FES e agregar às moléculas já existentes outras com grande potencial (Athanázio-Heliodoro et al., 2018).

3. Grãos Secos de Destilaria com Solúveis (DDGS) de Milho

Os grãos secos de destilaria com solúveis ou “Dried Distillers Grains with Solubles” (DDGS) são subprodutos da produção de etanol obtido do milho durante o processo de fermentação, possuindo em sua composição fibras e proteínas e, por isso, são muito utilizados na alimentação animal (Brito, 2008).

O milho é a terceira cultura mais produzida em nosso país com mais de 100,6 milhões de toneladas no ano de 2019 (IBGE, 2020), sendo que o estado do Mato Grosso está em primeiro no *ranking* nacional de produção com 31,5 milhões de toneladas e o estado de São Paulo na sétima colocação com 4,8 milhões de toneladas (IBGE, 2020). A estimativa para a produção de etanol de milho na safra 2020/21 é de 2,75 bilhões de litros (UNEM, 2020). A cada 2,54 kg de milho fermentado são produzidos 1,02 L de etanol, 0,28 kg de dióxido de carbono e 0,82 kg de DDGS (Lim e Yildirim-Aksoy, 2008) - considerando a quantidade de etanol produzida na safra de 2020/21 e a quantidade gerada de DDGS a cada litro produzido, estima-se que nessa safra terá uma produção aproximada de 2,2 bilhões de DDGS.

Os DDGS podem ter reaproveitamento como alimento na ração animal pelo seu alto valor de proteína, fibra e energia, conferindo alto valor agregado neste processo (Brito, 2008). Além disso, pode ser utilizado como substrato para FES para a produção de proteínas, enzimas e outros compostos bioativos (Lopes et al., 2017; Alltech, 2019; Prado et al., 2019).

A utilização do resíduo e subproduto mencionados acima pode ser ótima opção para a obtenção de proteínas, enzimas e antioxidantes, e, posterior uso na alimentação animal. Isso deve-se tanto devido à expressão das culturas no Brasil e no mundo; à produção destes em grande quantidade; à composição em macro e micronutrientes; ao baixo valor atual comercial; e à sustentabilidade ambiental e econômica dos bioprocessos diretos e indiretos (FES) de obtenção de biomoléculas (Fleuri, 2016).

4. Proteínas

As proteínas são macromoléculas e estão presentes em todos compartimentos e processos celulares. São formadas pelos 20 aminoácidos proteínogênicos e exercem diversas funções como: enzimas, hormônios, anticorpos, estruturais, de transporte, entre outras (Nelson e Cox, 2014).

A proteína é um componente de extrema importância para o animal, sendo então exigido na alimentação para a sua manutenção e produção (Furuya et al., 2010). Os peixes necessitam de certas quantidades de aminoácidos essenciais e não-essenciais, para que as dietas sejam balanceadas (Wilson, 2002). As proteínas podem ter origem animal

e vegetal - o que difere é a composição e biodisponibilidade dos aminoácidos de cada um, sendo que para os peixes, de modo geral, os aminoácidos mais importantes são a lisina, metionina, treonina e triptofano (Furuya et al., 2010).

As tilápias, por exemplo, exigem 10 aminoácidos essenciais, sendo eles a arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e valina (Furuya et al., 2010). Quando fornecidos em proporções adequadas nas dietas de peixes não ocasionam efeitos prejudiciais em seu desempenho e saúde, bem como reduzem as perdas por excreção (Botaro et al., 2007).

Em rações comerciais, em uma produção intensiva de piscicultura, a proteína pode variar entre 24 e 70%, dependendo da espécie e do estágio de vida (Teles et al., 2020), podendo representar aproximadamente 50% do custo da produção (NRC, 2011; Craig et al., 2017). Por isso, fontes proteicas de menor custo vem sendo empregadas para tornar a produção mais rentável e sustentável (Hassaan et al., 2020). Assim, os resíduos e subprodutos agroindustriais vegetais mostram-se como alternativas, porém, o conteúdo proteico desses materiais pode estar em formas não absorvíveis. Assim, o uso de enzimas exógenas como aditivos podem degradar os fatores antinutricionais (Jiang et al., 2014; Hassaan et al., 2019) e proporcionar uma melhora na população microbiana no intestino, melhorando a digestão e absorção dos nutrientes em peixes (Jiang et al., 2014). Dentre as enzimas exógenas que são importantes para serem inseridas nas dietas estão as lipases, proteases, amilases e fitases, que serão abordados neste estudo.

5. Enzimas

5.1. Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3 - triacilglicerol éster hidrolase) são enzimas que *in vivo* hidrolisam triglicerídeos de cadeia longa, liberando ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol (Beisson et al., 2000; Carvalho et al., 2003).

São originárias em bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades diferenciadas de acordo com sua fonte (Saxena e Singh, 2011). As lipases provenientes de micro-organismos constituem um dos grupos de enzimas que são mais valorizadas nas aplicações biotecnológicas - isto se deve à facilidade de obtenção a partir do meio fermentativo, às propriedades bioquímicas diversificadas e interessantes (Campos et al., 2002; Hasan et al., 2006), bem como a possibilidade de aplicação em diferentes setores, como alimentício, farmacêutico, têxtil e cosmético (Houde et al., 2004; Hasan et al., 2006).

Nunes et al. (2006) utilizando lipases exógenas a partir do fungo *Aspergillus oryzae* na alimentação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) verificaram

melhor desempenho zootécnico (ganho de peso, conversão alimentar aparente e taxa de crescimento específico) com a adição de 0,2% de lipase na ração, isto mostra a melhora do aproveitamento dos lipídeos na dieta, disponibilizando energia não-proteica e poupando, assim, a energia das proteínas. Liu et al. (2016) com o uso de lipases exógenas comercial (VTR Bio-tech Co., Ltd., Guangdong) na alimentação de juvenis de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) observaram melhora no desempenho, barreira física intestinal e imunidade desses peixes recomendando o uso de 1193 U kg⁻¹ ou em 0,33% na dieta. Em Cavero et al. (2019) utilizaram lipases exógenas do fungo *Aspergillus niger* nas doses de 0,1; 0,2 e 0,4% nas dietas de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) não tendo diferenças entre as doses. Os autores recomendaram o uso da enzima para a melhora no desempenho zootécnico para o ganho de peso, taxa de crescimento e conversão alimentar.

Os estudos têm demonstrado que as lipases podem ser utilizadas nas dietas na piscicultura melhorando em alguns aspectos, podendo ser usadas em conjunto de outras enzimas, como os complexos enzimáticos para ter uma melhor produtividade.

5.2. Proteases

As proteases (EC 3.4.23.18) estão presentes em todos seres vivos e tem como função a hidrólise das ligações peptídicas da proteína, podendo apresentar também atividade de síntese, unindo as ligações éster e amida a partir de aminoácidos e peptídeos livres (Rao, 1998).

As proteases apresentam grande relevância no mercado industrial - representam 60% das enzimas industriais (Bano et al., 2016; Singh et al., 2016) - devido à sua versatilidade de aplicações, sendo usadas nas indústrias de alimentos (Raveendran et al., 2018), de couro (Singh e Bajaj, 2017), de limpeza (Giri et al., 2011), biorremediação (Peralta et al., 2017) e farmacêutica (Kumar et al., 2015). As proteases microbianas, principalmente de origem fúngica, são de fácil obtenção, pois a sua produção é majoritariamente extracelular (Kumar et al., 2005).

As proteases exógenas aumentam o valor nutricional das proteínas vegetais nas dietas, hidrolisando-as em aminoácidos livres e liberando alguns nutrientes que não estão disponíveis (Hassaan et al., 2019).

Novelli et al. (2017) utilizaram proteases obtidas por FES com *Aspergillus oryzae*, em dietas com 2500 U g⁻¹ para tilápias-do-Nilo tendo como proteína de origem vegetal o farelo de soja. Os autores relataram melhor disponibilidade de proteínas, minerais, energia e lipídios, promovendo assim melhor digestibilidade do vegetal inserido na dieta como fonte de proteína bruta. Cavero et al. (2019) utilizaram protease de origem fúngica (*Aspergillus oryzae*) na alimentação de pirarucu (*Arapaima gigas*) com a inclusão de

0,1; 0,2 e 0,4% nas dietas, e relataram melhor desempenho zootécnico (taxa de crescimento, ganho de peso e conversão alimentar). Ambas as pesquisas recomendam o uso de enzimas exógenas na alimentação de peixes para melhor aproveitamento dos nutrientes e melhor desempenho animal.

Hassaan et al. (2020), utilizando proteínas de origem vegetal e proteases exógenas comerciais (*Rizopus sp.* Sigma-Aldrich, CAS 9001-927) na alimentação de tilápias-do-Nilo, obtiveram melhora no crescimento, eficiência alimentar e aumento da resposta imune dos peixes. Outro trabalho realizado com a inclusão de 5,52 U g⁻¹ de protease comercial (SunHY Biology) em dietas a base de proteína vegetal para tilápias-do-Nilo também promoveu melhor desempenho quanto ao crescimento, melhora na barreira física intestinal, imunidade inata e resistência a *Streptococcus agalactiae* (Wu et al., 2020).

5.3. Amilases

As amilases (EC 3.2.1.1 - α -amilases; EC 3.2.1.3 – amiloglucosidade; EC 3.2.1.20 – α -glucosidase) são as enzimas responsáveis pela degradação da molécula de amido, quebrando as ligações α -1,4 e α -1,6 da amilose e amilopectina, formando compostos menores como glicose, maltose e dextrinas, podendo ser aplicadas em diferentes segmentos da indústria como alimentícia, têxtil, farmacêutica, papel e celulose, entre outras (Polizeli e Silva, 2016; Gopinath et al., 2017). É o segundo grupo de enzima mais importante no mercado enzimático, representando 25% da produção mundial sendo precedido apenas pelas proteases (Souza e Magalhães, 2010).

Substratos provenientes de amido e/ou substâncias amiláceas podem ter alto potencial para a produção de amilases com o uso de micro-organismos (Cherry, 2004; Saxena e Singh, 2011). Os resíduos e subprodutos da agroindústria podem conter grandes quantidades de amido, como por exemplo os do processamento do milho (amido), trigo, aveia, arroz, batata e mandioca, o que são importantes na obtenção da enzima (Nigam e Singh, 1995).

Nunes et al. (2006) utilizaram em seu estudo 0,05% de amilases exógenas obtidas pelo *Aspergillus oryzae* nas dietas, resultando em melhor desempenho zootécnico (taxa de crescimento, conversão alimentar e ganho de peso) em juvenil de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Stech (2009) utilizando amilase exógena provenientes de *Bacillus amyloliquefaciens* na dieta de cacharas (*Pseudoplatystoma reticulatum*) observou melhor digestibilidade aparente dos nutrientes e absorção de minerais.

5.4. Fitase

A fitase pode ser classificada conforme o seu pH (fitases ácidas e alcalinas); e de acordo com a posição do fosfato a ser hidrolisado podendo ser nomeado 3-fitase (E.C. 3.1.3.8 mio-inositol hexacisfosfato 3-fosfo-hidrolase), 6-fitase (E.C. 3.1.3.26 mio-inositol hexacisfosfato 6-fosfo-hidrolase) e 5-fitase (E.C. 3.1.3.72 mio-inositol hexacisfosfato 5-fosfo-hidrolase) (Lei e Porres, 2003; Greiner e Konietzny, 2006; Bedford e Partridge, 2010).

As fitases hidrolisam os grupos fosfatos e ácido fítico em fosfato inorgânico, eliminando as propriedades antinutricionais (Vohra e Satyanarayana, 2003; Singh et al., 2011). Muitos vegetais, como por exemplo soja, trigo, milho, ervilha, centeio, entre outros apresentaram atividade de fitase, mas o processo de obtenção e extração a partir dessas fontes em comparação às microbianas são mais demorados, o que pode caracterizar uma limitação (Gupta et al., 2015).

Os alimentos de origem vegetal possuem em sua maior parte o fósforo na forma de ácido fítico, sendo esta forma indisponível para a alimentação de animais não-ruminantes, além de ser um fator antinutricional ligando-se às proteínas, aminoácidos lipídeos e minerais, prejudicando a absorção dos nutrientes (Bohn et al., 2007).

O uso da fitase exógena nas dietas dos animais monogástricos é recomendável para o melhor aproveitamento dos nutrientes contidos nas rações implicando numa menor excreção de fósforo fítico. Além disso, esse fósforo pode ser utilizado como substituinte ao inorgânico, minimizando a eutrofização, que no caso da piscicultura, prejudica a qualidade da água (Van Der Ploeg e Boyd, 1991; Pizzolante, 2000; Choct, 2006).

Liu et al. (2013) relataram o uso de fitase (isolado por *Pedobacter* sp. MJ11 CGMCC nº. 2503, sintetizado por SunHY Biology Co., Ltd.) nas dietas de zebrafish (*Danio rerio*) o que aumentou a taxa de sobrevivência, crescimento, quantidade de prole, lipídeos corporais e diminuiu as concentrações de nitrogênio-amônia e nitrito na água. Novelli et al. (2017) usaram a fitase exógena, de origem fúngica (*A. niger*) obtidas por FES, na alimentação de tilápias-do-Nilo utilizando uma dieta com dose de 7000 U g⁻¹ que incluía proteína de origem vegetal. Os autores relataram a importância dessa enzima na redução de minerais excretados com aumento da disponibilidade desses minerais, possibilitando melhora na digestibilidade. Maas et al. (2020) usando fitase (*Buttiauxella* sp., DuPont Nutrition and Bioscience, Leiden, NL) nas dietas de tilápia-do-Nilo relataram uma melhora na digestibilidade dos nutrientes, energia, carboidratos totais e minerais (fósforo e cálcio).

6. Compostos Antioxidantes

Compostos antioxidantes são substâncias que inibem ou retardam o processo de oxidação de diferentes biomoléculas que são constituintes celulares (Abdalla e Faine, 2008). O metabolismo oxidativo tem a função de gerar energia para as atividades celulares primordiais, sendo que os radicais livres são produzidos por meio da reação do metabolismo do oxigênio nas células vivas, cuja produção excessiva pode causar danos celulares (Abate et al., 1990; Archer et al., 1994).

Compostos com propriedade antioxidante atuam na prevenção dos danos oxidativos pela inibição e redução dos radicais livres, mantendo a estrutura e função das células (Liochev, 2013; Zou et al., 2016). Rahman et al. (2019) utilizaram casca do limão na dieta de tilápias-do-Nilo e bagres-africanos (*Clarias gariepinus*) com o intuito de avaliarem a ação antioxidante, sendo que os autores indicam o uso desse aditivo para aumentar a resistência a doenças. Vicente et al. (2019) avaliaram a atividade do sistema antioxidante das tilápias-do-Nilo com o uso de frit de laranja da variedade Pêra na dieta, o qual influenciou positivamente a capacidade enzimática antioxidante sob estresse por calor e oxigênio dissolvido.

7. Citotoxicidade

O cultivo celular é uma ferramenta que permite analisar atividades biológicas de compostos em ambiente controlado e confiável (Helgason e Miller, 2004; Zucco et al., 2004).

Entre as técnicas de cultivo celular está a toxicologia *in vitro* utilizada para avaliar possíveis efeitos nocivos de compostos sobre o desenvolvimento celular; que pode ser realizada por análises visuais de inibição e por métodos colorimétricos (Cruz et al., 1987; Rogero et al., 2000). O uso de corantes na cultura celular faz com que seja possível identificar se ocorreu algum dano ou morte das células pela intensidade da cor (Ciapetti et al., 1996).

As células de fibroblastos embrionários obtidas por embriões de camundongos da linhagem NIH-3T3 foi estabelecida por Jainchil et al. (1969) e atualmente podem ser encontradas comercialmente. Esta linhagem celular é utilizada como células padrão em ensaios de toxicidade celular (Bittencourt, 2011), em geral, conduzidas com o método do corante brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O MTT avalia o metabolismo mitocondrial das células de forma fácil, rápida, eficaz e quantitativa (Eldeniz et al., 2007; Bittencourt, 2011).

Até o momento, não foram encontradas na literatura pesquisas de citotoxicidade de produtos a serem aplicados na piscicultura.

Referências Bibliográficas

ABATE, C.; PATEL, L.; RAUSCHER, F. J. III; CURRAN, T. Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. **Science**, Washington, v. 249, p. 1157–1161, 1990.

ABDALLA, D. S. P.; FAINE, L. A. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª edição. São Paulo: Atheneu Editora, p. 37-58, 2008.

ALLTECH. Alltech, 2019. Rações Alternativas. Disponível em: <<https://pt.alltech.com/future-of-farming/alternative-feeds>>. Acesso em: 10/06/2019.

AMORIM, G. M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. **Dissertação** – Programa de pós Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Itapetinga, Bahia, 2011.

ANSELMO, A. A. S. Resíduos de frutos amazônicos como ingredientes alternativos em rações extrusadas para juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Dissertação** – Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2008.

ARAÚJO, L. F. Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida. **Tese** – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2004.

ARCHER, S. L.; HUANG, J. M. C.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K-channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 91, p. 7583-7587, 1994.

ATHANAZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO, C. H.; FERNANDES, C. J. C.; ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z.; SILVA, R. A.; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M.; FLEURI, L. F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 14, p. 1-9, 2018.

BANO, S.; DAHOT, M. U.; NAQVI, S. H. A. Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. **Pakistan Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 193-198, 2016.

BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. Enzymes in farm animal nutrition. 2nd edition. London, UK, p. 319, 2010.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 102, n. 2, p. 133-153, 2000.

BITTENCOURT, L. S. Efeito de *paullinia cupana* (Mart.) no estresse oxidativo induzido pelo nitroprussiato de sódio em células de fibroblastos embrionários NIH-3T3. **Dissertação** – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, 2011.

BOHN, L.; JOSEFSEN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Quantitative analysis of phytate globoids isolated wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55 (18), p. 7547-7552, 2007.

BOTARO, D.; FURUYA, W. M.; SILVA, L. C. R.; SANTOS, L. S.; SILVA, T. S. C.; SANTOS, V. G. Redução da proteína da dieta com base no conceito de proteína ideal para tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 517-525, 2007.

BRITO, C. Uso do DDGS, um subproduto na produção do etanol, na alimentação de monogástricos. **Artigo Técnico Poli-Nutri alimentos**. 2008.

CAMPOS, P. R. B.; OLIVEIRA, B. F.; NOFFS, M. D.; CARVALHO, P. O. Isolamento e seleção de microorganismos produtores de lipase como biocatalizadores na hidrólise parcial de óleo de sardinha. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 1, p. 07-14, 2002.

CARVALHO, F. C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 22, n. 12, p. 31-46, 1992.

CARVALHO P. O.; BUENO-CAMPOS P. R., D'ADDIO N. M.; DE OLIVEIRA J. G.; TSUNEZI S. M.; DA SILVA D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 75-80, 2003.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 303-308, 2015.

CAVERO, B. A. S.; ITUASSÚ, D. R.; GANDRA, A. L.; MARINHO-PEREIRA, T.; FONSECA, F. A. L.; PEREIRA-FILHO, M. Exogenous enzymes on the feeding of pirarucu *Arapaima gigas* Schinz. 1822 (Osteoglossiformes. Arapaimidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, n. 1, e5601, 2019.

CHERRY, H. M.; HUSAIN, T.; ANWAR, M. N. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 7, v. 11, p 1988-1992, 2004.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **Word's Poultry Science Journal**, p. 5-15, 2006.

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

CITRUSBR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. Laranja e suco.

CRAIG, S.; HELFRICH, L. A.; KUHN, D.; SCHWARZ, M. H. Understanding fish nutrition, feeds, and feeding, **Virginia Cooperative Extension**, p.1-6, 2017.

CRUZ, A. S.; CUPPOLONI, K. M.; MARTINEZ, C. H. O.; GOMES, L. F. S. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1/2, p. 51-57, 1987.

DOAN, H.V.; HOSEINIFAR, S.H.; ELUMALAI, P.; TONGSIRI, S.; CHIMANAT, C.; JATURASITHA, S.; DOOLGINDACHBAPORN, S. Effects of orange peels derived pectin

on innate immune response, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc system. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 80, p. 56-62, 2018.

ELDENIZ, A. U.; MUSTAFA, K.; ORSTAVIK, D.; DAHL, J. E. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 5, p. 329-337, 2007.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Considerações sobre a produção de laranja no Estado de São Paulo (2013).

FAOSTAT, 2017. Citrus fruit fresh and preprocessed. **Statistical Bulletin**. Rome, 2016.

FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 9, n. 2, p. 207-213, 2011.

FLEURI, L. F. Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. **Tese de livre docência** – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Botucatu, 2016.

FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; PEDROSA, V. A.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P.; NOVELLI, P. K.; DELGADO, C. Exploration of Microorganisms Producing Bioactive Molecules of Industrial Interest by Solid State Fermentation. In: LIMA, G.P.P.; VIANELLO, F. **Food Quality, Safety and Technology**. 1 ed.: Springer-Verlag Wien, v. 1, p. 147-161, 2013.

FRANCISCO, V. C. B.; OKINO-DELGADO, C. H.; ZANUTTO- ELGUI, M. R.; FERNANDES, C. J. D. C.; FACANALI, R.; DA SILVA, R. A.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M; FLEURI, L. F. Plant oil bioconversion into increase biological activity through lipases derived from wastes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 4, p. 1089-1099, 2018.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; BOSCOLO, W. R.; CYRINO, J. E. P.; FURUYA, V. R. B.; FEIDEN, A. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. – Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food research International**, Amsterdam, v.42, n. 5/6, p.577-587, 2009.

GIRI, S. S.; SUKUMARAN, S.; SEN, S. S.; OVIYA, M.; BANU N.; JENA, P. K. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 455-461, 2011.

GOPINATH, S. C. B; ANBU, P.; MD ARSHAD, M. K.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASHIM, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, n. 2017, p. 1-9, 2017.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for food application. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.44, n.2, p.123-140, 2006.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. **Journal of Food Science and Technology**, Campinas, v.52, n.2, p.676-684, 2015.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology**, in press, 2006.

HASSAAN, M. S.; EL-SAYED, A. I. M.; SOLTAN, M. A.; IRAQI, M. M.; GODA, A. M.; DAVIES, S. J.; RAMADAN, H. A. Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 503, p. 282–292, 2019.

HASSAAN, M. S.; MOHAMMADY, E. Y.; ADNAN, A. M.; ABD ELNABI, H. E.; AYMAN, M. F.; SOLTAN, M. A.; EL-HAROON, E. R. Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal free diets. **Aquaculture**, v. 522, 2020.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.

HELGASON, C.; MILLER, C. Basic cell culture protocols. **Humana Press**: Totowa. 2004. HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, London, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, p. 118-125, 2004.

JAINCHILL, J. L.; AARONSON, S. A.; TODARO, G. J. Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. **Journal of Virology**. p. 549-553, 1969.

JIANG, T. T.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, W. D.; JIANG, J.; LI, S. H.; ZHOU, X. Q. Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 632-645, 2014.

KIM, E.; JEON, I. S.; KIM, J. W.; KIM, J.; JUNG, H. S.; LEE, S. J. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. **Oral Diseases**, v. 13, n. 5, p. 495-499, 2007.

KONSOULA, Z.; LIA KOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 150-157, 2007.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAM, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, 2005.

KUMAR, R. S.; RAJESH, R.; GOKULAKRISHNAN, S.; SUBRAMANIAN, J. Screening and characterization of fibrinolytic protease producing *Bacillus circulans* from mangrove

sediments Pitchavaram, South East Coast of India. **International Letters of Natural Sciences**, v. 28, p. 10-16, 2015.

LAZZARI, R.; UCZAY, J.; RODRIGUES, R. B.; PIANESSO, D.; ADORIAN, T. J.; MOMBACH, P. I. Utilização de resíduos de frutas em dietas para piava. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo - SP, v. 41, p. 227-237, 2015.

LEI, X. G., PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1787-1794, 2003.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M. Distillers dried grains with solubles as an alternative protein source in fish feeds. In: **8th International symposium on tilapia in aquaculture**, p. 67-82, 2008.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radicals theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 60, p. 1-4, 2013.

LIU, L. W.; SU, J. M.; LIANG, X. F.; LUO, Y. L. Growth performance, body lipid, brood amount, and rearing environment response to supplemental neutral phytase in zebrafish (*Danio rerio*) diet. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 433, 2013.

LIU, S.; FENG, L.; JIANG, W. D.; LIU, Y.; JIANG, J.; WU, P.; ZHOU, X. Q. Impact of exogenous lipase supplementation on growth, intestinal function, mucosal immune and physical barrier, and related signaling molecules mRNA expression of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 55, p. 88-105, 2016.

LONSANE, B. K., GHIDYAL, N. P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHINA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LOPES, P. H. R.; SILVA, J. V. I.; PEREIRA, M. S.; FLEURI, L. F. Produção de lipases e antioxidantes fúngicos por fermentação em estado sólido utilizando novos resíduos. In: III Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017, Araraquara. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 38, p. 382, 2017.

MAAS, R. M.; VERDEGEN, M. C. J.; STEVENS, T. L.; SCHRAMA, J. W. Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutrient digestibility and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different quality diets. **Aquaculture**, v. 529, 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 9, p. 770-778, 1995.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; ARAUJO, E. P.; BOTELHO, R. M.; FLEURI, L. F. Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding alternative. **Aquaculture**, v. 481, p. 1-7, 2017.

NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp**. National Academies Press, Washington, DC, 2011.

NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tabaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 139-143, 2006.

OKINO, C. H.; PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Brazilian fruit processing wastes as a source of lipase and other biotechnological products: a review. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 3, p. 2927-2943, 2018.

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103–107, 2014.

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description - A review. **Food Reviews International**, v. 32, p. 1–14, 2016.

OKINO-DELGADO, C. H.; PEREIRA, M. S.; SILVA, J. V. I.; KHARFAN, D.; PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Lipases obtained from orange wastes: Commercialization potential and biochemical properties of different varieties and fractions. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, 2018.

ORIOU, E. Croissance d'*Aspergillus niger* sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau. **Tese** – Doutorado em Microbiologia, INSA Toulouse, 27, p. 113, 1987.

PALMA, M.B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDEY, A. Solid state fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 13, p. 81-84, 2003.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**. v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PERALTA, R. M.; SILVA, B. P.; CÔRREA, R. C. G.; KATO, C. G.; SEIXAS, F. A. V.; BRACHT, A. Enzymes from Basidiomycetes – peculiar and efficient tools for biotechnology. In: G. BRAHMACHARI (Ed.): **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p. 119-149, 2017.

PEREIRA, M. S. Resíduos de laranja como fonte de enzimas e compostos bioativos. **Dissertação** (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', Botucatu-SP, 2017.

PIZZOLANTE, C. C. Estabilidade da fitase e sua utilização na alimentação de frangos de corte. **Tese** (Doutorado). Bibliografia. Lavras: UFLA, 2000.

POLIZELI, M. L. T. M.; SILVA, T. M. **Amilases microbianas**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 268, 2016.

PRADO, D. Z.; OKINO-DELGADO, C. H.; ZANUTTO-ELGUI, M. R.; SILVA, R. B. G.; PEREIRA, M. S.; JAHN, L.; LUDWIG-MÜLLER, J.; SILVA, M. R.; VELINI, E. D.; FLEURI, L. F. Screening of *Aspergillus*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains and influence of

substrates on auxin and phytases production through solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 2019.

RAHMAN, A. N. A.; ELHADY, M.; SHALABY, S. I. Efficacy of the dehydrated lemon peels on the immunity, enzymatic antioxidant capacity and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v. 505, p. 92-97, 2019.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 62, p. 597–635, 1998.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; UMMALYMA, S. B.; ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; MADHAVAN, A.; PANDEY, A. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 197-203, 2003.

ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROSA, C. B. S.; BORSATO, D.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, A. P. C. Naringinase de *Aspergillus niger*: Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 32, n. 3, p. 1049-1058, 2011.

SATARI, B., KARIMI, K. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recente advances, and future perspectives in total valorization. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 129, p. 153–167, 2018.

SAXENA, R.; SINGH, R. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus sp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1334-1342, 2011.

SINGH, B.; KUNZE, G.; SATYANARAYANA, T. Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 3, p. 69-87, 2011.

SINGH, R.; MITTAL, A.; KUMAR, M.; MEHTA, P. K. Microbial protease in commercial applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological**, v. 4, n. 3, p. 365-374, 2016.

SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment**, v. 2, n. 6, p. 370-386, 2017.

SOCCOL, R. S.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205–218, 2003.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

STECH, M. R. Enzimas Exógenas na alimentação de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). **Tese – Doutorado em Zootecnia**. Faculdade de Ciências Agrárias e

Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2009.

TELES, A. O.; COUTO, A.; ENES, P.; PERES, H. Dietary protein requirements of fish—a meta-analysis. **Reviews in Aquaculture**, v.12, n.3, p.1445-1477, 2020.

VAN DER PLOEG, M.; BOYD, C. E. Geosmin production by cyanobacteria (blue green algae) in fish ponds at Auburn, Alabama. **Journal World Aquaculture**. v. 22, p. 207-216, 1991.

VICENTE, I. S. T.; FLEURI, L. F.; CARVALHO, P. L. P. F.; GUIMARÃES, M. G.; NALIATO, R. F.; MULLER, H. C.; SARTORI, M. M. P.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. **Aquaculture Research**, v. 50, p. 80-92, 2019.

VILAS BOAS, E. V. B.; Lima, L. C. O.; BRESSAN, M. C.; BARCELOS, M. F. P.; PEREIRA, R. G. F. A. **Manejo de Resíduos da Agroindústria**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 110, 2001.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 29-60, 2003.

WILSON, R. P. Amino acids and proteins. Fish nutrition. Academic Press. Amsterdam, AM, The Netherlands. p. 143-179, 2002.

WU, J. J.; LIU, W.; JIANG, M.; ZHOU, Y.; WANG, W. M.; WEN, H.; LIU, H. Beneficial effects of dietary exogenous protease on the growth, intestinal health and immunity of GIFT (*Oreochromis niloticus*) fed plant-based diets. **Aquaculture Nutrition**, v.26, n.5, p.1822-1834, 2020.

ZEMA, D. A.; FÒLINO, A.; ZAPPIA, G.; CALABRÒ, P. S.; TAMBURINO, V.; MARCELLO, S. Anaerobic digestion of orange peel in a semi-continuous pilot plant: An environmentally sound way of citrus waste management in agro-ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 630, p. 401–408, 2018.

ZOU, Z.; XI, W.; HU, Y.; NIE, C.; ZHOU, Z. Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 885–896, 2016.

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigation with cell cultures systems: 20 years after. **Toxicolo In Vitro**. v. 18, p. 153-163. 2004.

Capítulo II: Obtenção e caracterização de complexos multibioativos obtidos a partir de resíduo e subproduto visando aplicação como aditivos na piscicultura

Resumo: Os resíduos e subprodutos agroindustriais vêm sendo utilizados por fermentação em estado sólido (FES) para gerar produtos de valor agregado com bioatividades. Neste trabalho, fragmento de casca de laranja (frit) da variedade Pêra e grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) de milho foram utilizados de forma isolada e como substrato em FES utilizando *Aspergillus flavipes* (ATCC 16841), *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) e *Aspergillus niger* (CBMAI 2084) para produção de complexos multibioativos (CMB), nos quais foram determinadas as atividades de lipases, proteases, amilases, fitases, antioxidantes e concentrações de proteínas solúveis totais, aminoácidos aromáticos. A pesquisa ainda incluiu a produção em massa dos CMB mais promissores com caracterizações quanto ao pH e temperaturas ótimas das enzimas; e, análises químico-bromatológicas e de citotoxicidade dos complexos. Os CMB fermentados foram melhores em todas as análises em relação aos isolados. Os CMB DDGS fermentados com *A. flavipes* e *A. oryzae* não apresentaram crescimento fúngico. Os CMB DDGS + *A. niger* e frit + *A. niger* obtiveram resultados semelhantes estatisticamente ($p \geq 0,05$) para as atividades enzimáticas de lipase utilizando palmitato ($35,16$ e $29,72 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e de fitase ($544,52$ e $470,44 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), respectivamente. CMB DDGS + *A. niger* apresentou resultado superior para a atividade enzimática de lipase por análise titulométrica ($19,25 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e para a redução do íon superóxido ($54,01\%$), bem como atividade de amilase semelhante ao valor encontrado no CMB frit + *A. oryzae* ($8,62$ e $6,19 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectivamente). CMB frit + *A. niger* apresentou resultados superiores para a atividade de protease ($22,67 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), proteínas solúveis totais ($2,44 \text{ mg mL}^{-1}$), aminoácidos aromáticos ($242,45 \text{ U g}^{-1}$) e antioxidante DPPH ($72,00\%$; $16,12 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação aos demais tratamentos. Os complexos multibioativos selecionados foram os CMB frit + *A. niger* e CMB DDGS + *A. niger*. O primeiro apresentou lipases com faixa de temperatura ótima de 20 a 80°C e pH ótimos em $6,0$ e $9,0$, enquanto o segundo também apresentou lipases com faixa de temperatura ótima de 20 a 80°C e pH ótimo de $7,0$. As proteases dos CMB fermentados apresentaram-se faixa ótima de temperatura e de pH estudadas (mantendo atividades acima de 85%). O CMB frit + *A. niger* apresentou fitases com pH ótimo $5,0$ e faixa de temperatura ótima entre 50 a 70°C , enquanto o CMB DDGS + *A. niger* apresentou o mesmo pH ótimo de $5,0$ e temperatura ótima de 50°C . Na análise químico-bromatológica dos complexos destacou-se a maior porcentagem de proteínas e fibras do CMB frit + *A. niger*. Ambos CMbs não foram nocivos à célula NIH-3T3.

Palavras-chave: antioxidante, fitase, lipase, protease, proteínas.

Abstract: Agroindustrial residues and by-products have been used by solid state fermentation (SSF) to generate aggregated trench products with bioactivities. In this work, fragment of orange peel (frit) of the Pêra variety and dry distillery grains with solubles (DDGS) of corn were used as substrate in SSF using *Aspergillus flavipes* (ATCC 16841), *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003) and *Aspergillus niger* (CBMAI 2084) for the production of multibioactive complexes (CMB) in witch activities of lipases, proteases, amylases, phytases and antioxidants, and total soluble proteins, amino acids concentration were determined. The research also included mass production of the most promising CMB with characterizations as to the optimum pH and temperature of the enzymes; and, chemical-bromatological and cytotoxicity analysis of the complexes. The fermized CMB were better in all analyzes compared to the isolates. CMB DDGS fermented with *A. flavipes* and *A. oryzae* did not fungal growth. CMB DDGS + *A. niger* and frit + *A. niger* obtained statistically similar results ($p \geq 0,05$) for the enzymatic activities of lipase palmitate ($35,16$ and $29,72 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and phytase ($544,52$ and $470,44 \mu\text{mol}$

$\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$), respective values. CMb DDGS + *A. niger* showed superior results for the enzymatic activity of titrometric lipase ($19,25 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), for the reduction of the superoxide ion (54,01%) and for the amylase activity was similar to value found in CMb frit + *A. oryzae* (8,62 and $6,19 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively). CMb frit + *A. niger* obtained superior results for protease activity ($22,67 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), total proteins ($2,44 \text{ mg mL}^{-1}$), aromatic amino acids ($242,45 \text{ U g}^{-1}$) and DPPH antioxidant (72,00%; $16,12 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) compared to others treatments. The selected multibioactive complexes were CMb frit + *A. niger* and CMb DDGS + *A. niger*. The first presented lipases at optimum temperatures from 20 to 80°C and optimum pH at 6,0 and 9,0, while the second also presented lipases at optimum temperatures from 20 to 80°C but with an optimum pH of 7,0. The proteases from the fermented CMb were optimum in the temperature and pH range studied (maintaining activities above 85%). The CMb frit + *A. niger* presented phytases with an optimum pH of 5,0 and an optimum temperature range between 50 to 70°C , while the CMb DDGS + *A. niger* had the same optimum pH of 5,0 and an optimum temperature of 50°C . In the chemical bromatological analysis, the highest percentage of proteins and fibers from CMb frit + *A. niger*. Both CMbs were not harmful to the NIH-3T3 cell.

Keywords: antioxidant, phytase, lipase, protease, proteins.

1. Introdução

O Brasil produz elevado volume de biomassa vegetal de baixo custo que pode ser parcialmente utilizada em processos fermentativos em estado sólido (FES) para produção de compostos bioativos (Jácome, 2019).

Os fungos filamentosos são encontrados em todo país em sua cobertura vegetal do solo (Pereira et al., 2017). São micro-organismos eucariontes e quimioheterotróficos, dotados de imenso potencial de degradação da matéria orgânica, utilizando-a como fonte de carbono e energia (Tortora, 2016) para o crescimento e produção de metabólitos (Fleuri et al., 2013). Possuem capacidade de produzir proteínas e dentre estas, enzimas e outros compostos bioativos. Os compostos bioativos podem apresentar diferentes funções (Madigan, 2017) como ação antilinfocítica e antifécciosa (Guimarães et al., 2014; Iqbal et al., 2015), hipocolesterolêmica (Jahromi et al., 2012), inibitória da angiogênese e antiparasitária (Bracarense e Takahashi, 2014), bem como antioxidante e antimicrobiana (Zanutto-Elgui et al. 2019). O gênero *Aspergillus* é, dentre os fungos, o gênero mais promissor na produção enzimática, podendo excretar mais de 20 tipos desses biocatalisadores (Silveira et al., 2007).

A FES é um bioprocesso em que as enzimas e outras biomoléculas de origem fúngica são produzidas de forma viável e rentável e que se caracteriza pela utilização de resíduos ou subprodutos como substratos (Saxena e Singh, 2011). Além disso, nesse tipo de fermentação o resíduo ou subproduto pode ser utilizado de forma umedecida, visando mimetizar as condições de crescimento de fungos para que estes excretem no meio de cultivo enzimas e outros compostos com atividades biológicas promissoras (Lima et al., 2001).

As enzimas exógenas produzidas por meio de FES são utilizadas na dieta de animais não ruminantes em alimentos com baixa digestibilidade, visando também favorecer a redução de nutrientes excretados no meio, o que pode contribuir com a diminuição da contaminação do ambiente (Campestrini et al., 2005).

Dentre as enzimas de interesse na alimentação de peixes estão as lipases, proteases, amilases e fitases. A lipase atua na liberação de ácidos graxos e glicerol, desempenhando funções energéticas (Moura et al., 2012), sendo que essa energia disponibilizada de natureza não-proteica poupa a proteína a ser usada como fonte energética (Nunes et al., 2006). A amilase melhora a disponibilidade aparente do amido (Oliveira et al., 2007); enquanto proteases aumentam a biodisponibilidade de proteínas e minerais no trato digestório dos peixes (Morales et al., 2011). Já as fitases reduzem os efeitos antinutricionais do fitato, disponibilizando o fósforo, outros minerais, aminoácidos e energia (Munir e Maqsood, 2013), bem como reduzem a contaminação do ambiente devido à melhora na digestibilidade dos alimentos e menor excreção de

nutrientes na água (Mora-Jaimes et al., 2002; Signor et al. 2010). As proteínas são de extrema importância para manter a homeostase dos peixes, os aminoácidos então são componentes necessários exigido pelo animal para o seu desenvolvimento e desempenho (Furuya et al., 2010). Os compostos antioxidantes também apresentam papel importante na alimentação dos peixes atuando no aumento da imunidade e prevenção de doenças (Rahman et al., 2019).

Os resíduos e subprodutos de origem vegetal são materiais abundantes e de baixo custo para uso na alimentação de não ruminantes, os quais podem ser enriquecidos por processos fermentativos para produção de enzimas, proteínas e antioxidantes, e estes aplicados na alimentação de peixes de forma padronizada e segura.

2. Objetivo Geral

Obtenção de complexos multibioativos por processo custo-efetivo com impacto socioambiental e inovador para a piscicultura, contendo atividades enzimáticas, conteúdo proteico, aminoacídico e antioxidante, caracterizado bioquimicamente, químico-bromatologicamente e quanto à citotoxicidade.

2.1. Objetivos Específicos

- Obter e processar resíduo de laranja e subproduto do milho;
- Fermentar os substratos de frit de laranja da variedade Pêra e de grãos secos de destilaria com solúveis de milho com fungos;
- Avaliar as atividades enzimáticas de lipase, protease, amilase e fitase dos complexos multibioativos (CMb) isolados e fermentados;
- Avaliar a concentração proteica e de aminoácidos aromáticos dos CMb isolados e fermentados;
- Avaliar a atividade antioxidante dos CMb isolados e fermentados;
- Selecionar os CMb mais promissores e obtê-los em maior escala;
- Determinar as atividades enzimáticas, a concentração proteica e de aminoácidos aromáticos, bem como a atividades antioxidantes dos CMb selecionados;
- Caracterizar as enzimas dos CMb selecionados quanto ao pH e temperatura ótimos de atuação;
- Analisar bromatologicamente os CMb selecionados;
- Testar os CMb selecionados quanto à citotoxicidade.

3. Material e Métodos

O experimento foi realizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) no Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) no Departamento de Ciências Químicas e Biológicas (DCQB), no Laboratório de Bioprocessos (LBp).

3.1. Fungos e Resíduos

Foram utilizados os fungos *Aspergillus flavipes* (ATCC 16841), *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003), *Aspergillus niger* (CBMAI 2084) mantidos em *slant* em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), sob refrigeração a 5°C, os quais foram repicados a cada três meses de armazenamento. Os dois primeiros fungos foram obtidos por doação pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o último foi isolado pelo LBp e depositado junto à Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

O resíduo frit de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) da variedade Pêra foi obtido a partir do processamento da fruta para suco pela empresa J.B.T. Food Tech, localizada no município de Araraquara/SP (21° 47' 41" Sul, 48° 10' 36" Oeste). As amostras foram processadas e padronizadas como descrito por Okino-Delgado e Fleuri (2014).

O DDGS de milho foi obtido por doação pela empresa Cereale Brasil Agroindustrial LTDA, localizada no município de Dois Córregos/SP (22° 21' 57" Sul, 48° 22' 48" Oeste).

Os resíduos e fungos que foram utilizados nesta pesquisa estão regularizados quanto ao acesso do Patrimônio Genético sob o n. A3B3487 na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN).

3.2. Fermentação em estado sólido (FES)

Para a FES utilizou-se 10 g dos substratos frit de laranja e 10 g de DDGS de milho (apenas o DDGS foi umedecido com 10 mL de água deionizada) acondicionados, respectivamente, em coletores universais estéreis de 100 mL e em Erlenmeyers de 250 mL. Os coletores universais contendo o frit de laranja foram esterilizados em câmara de proteção biológica sob luz ultravioleta por 30 min; enquanto os Erlenmeyers contendo o DDGS de milho em autoclave a 121°C 1 atm por 20 min. Posteriormente, foram inoculados com 2 mL de solução de fungos (10^7 esporos/mL) a partir de *slants* das culturas microbianas com 96h de crescimento à 30°C em estufa (Incubadora Refrigerada tipo BOD SL-200/300 – Solab®). Os frascos com os substratos esterilizados e inoculados com os fungos foram mantidos por 96h a 30°C em estufa (Incubadora Refrigerada tipo BOD SL-200/300 – Solab®), visando a obtenção das moléculas de interesse (Fleuri et al., 2014; Athanázio-Heliodoro et al., 2018). Após o período de incubação o conteúdo foi liofilizado (liofilizador L101 – Liotop®) a -60°C por 48h. Os resíduos/subprodutos antes da FES foram denominados de Complexos Multibioativos

(CMB) isolados; enquanto, após a fermentação foram denominados de Complexos Multibioativos (CMB) fermentados. As bioatividades e/ou a quantificação de moléculas foram determinadas em ambos CMB.

O delineamento experimental contemplou o frit de laranja e DDGS de milho que foram inoculados com três fungos (*A. flavipes*, *A. oryzae*, *A. niger*) cada e tiveram três repetições, totalizando de 18 unidades experimentais (Figura 2).

3.3. Determinação das atividades enzimáticas

3.3.1. Lipase

A atividade lipolítica foi analisada como descrito por Macedo et al. (1997) e modificada por Athanázio-Heliodoro et al. (2018). O sistema reacional foi composto por 5,0 mL de azeite de oliva extra-virgem e solução de goma arábica 7% (proporção 25:75, v:v) homogeneizados; 3,0 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,5 g dos CMB. A reação foi conduzida em banho-maria (Dubnoff – Nova Ética) a 40°C por 30 min com agitação de 130 opm. A reação foi cessada com 15 mL de solução acetona:etanol (50:50, v:v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com NaOH ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), utilizando fenolftaleína como indicador. Para o cálculo foi usada curva padrão de ácido oleico, sendo cada unidade de atividade de lipase definida pela liberação 1 μmol de ácido graxo por min nas condições de ensaio.

A atividade de lipase também foi analisada utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP-16C, Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) seguindo a metodologia descrita por Mahadik et al. (2002), com adaptações. Para a reação foi utilizado 0,02 g do CMB; 2,7 mL de solução emulsionante (composto por 0,4 mL de triton X-100; 0,1 g de goma arábica; 90,0 mL de água destilada; 0,017 g 4-nitrofenil-palmitato e 12,0 mL de isopropanol) e 0,3 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). O sistema reacional foi incubado por 15 min a 40°C em banho-maria (banho-maria SL 150/10 – Solab). Após este período as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis). O sobrenadante foi utilizado para leitura da absorbância em espectrofotômetro (UV-visível Bel *Photonics* UV-M51) a 410 nm. Para o cálculo foi usada curva padrão de *p*-nitrofenil, sendo cada unidade de atividade de lipase definida pela liberação de 1 μmol de *p*-nitrofenil-palmitato por g de enzima nas condições de ensaio.

3.3.2. Protease

A atividade de protease foi determinada, com adaptações, utilizando o substrato azocaseína, segundo Charney e Tomarelli (1947). O sistema reacional foi composto por 0,5 mL de azocaseína (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) 0,5% em tampão fosfato de

sódio pH 7,0 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 0,005 g dos CMb e 0,1 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). A reação foi conduzida a 37°C por 40 min em banho-maria (banho-maria SL 150/10 – Solab), cessada com 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) e centrifugada a 3.000 rpm por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis). Após a centrifugação 1 mL do sobrenadante foi coletado e em seguida colocado 1 mL de hidróxido de potássio (5 mol L^{-1}). A leitura da absorbância foi em espectrofotômetro (UV-visível Bel *Photonics* UV-M51) a 428 nm. Cada unidade de atividade de protease foi definida pelo aumento da absorbância em 0,1 a 428 nm nas condições de ensaio.

3.3.3. Amilase

A atividade de amilase seguiu a metodologia de Miller (1959) utilizando 0,65 mL de amido 0,5% em solução tampão acetato de sódio pH 5,5 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,02 g dos CMb. O sistema reacional foi incubado em banho-maria (banho-maria SL 150/10 – Solab) a 60°C por 10 min, seguido de adição de 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico, banho em ebulição por 5 min, resfriamento em banho de gelo por 5 min e adição de 3,75 mL de água deionizada. A leitura foi em espectrofotômetro (UV-visível Bel *Photonics* UV-M51) a 540 nm. Curva padrão de glicose foi feita e utilizada para os cálculos. Cada unidade de atividade de amilase foi definida pela liberação de $1 \mu\text{mol}$ de açúcar redutor por min nas condições de ensaio.

3.3.4. Fitase

A atividade de fitase foi determinada segundo a metodologia de Stockmann et al. (2003) com adaptações, utilizando 0,005 g dos CMb, 1 mL de solução de 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$, Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e 0,5 mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$). O sistema reacional foi incubado a 37°C por 10 min (banho-maria SL 150/10 – Solab), a reação paralisada com 2 mL de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, seguido de centrifugação por 10 min a 3.000 rpm (centrífuga Q222T – Quimis) e leitura em espectrofotômetro (UV-visível Bel *Photonics* UV-M51) a 410 nm. A curva padrão utilizada para mensurar a atividade foi de p-nitrofenil, sendo cada unidade de atividade de fitase definida pela liberação de um μmol de p-nitrofenol por min de reação nas condições de ensaio.

3.4. Proteínas Solúveis Totais

A concentração de proteínas solúveis totais foi realizada conforme a metodologia de Bradford (1976). Foi utilizado 0,1 g dos CMb e 2,0 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,7 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), os quais foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis). Foi coletado 0,5 mL do sobrenadante e adicionado 2,5 mL da solução

filtrada do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* ($1,17 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), seguido de repouso por 15 min para reação. Após esse tempo foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-visível Bel *Photonics UV-M51*) a 595 nm em cubeta de plástico. Curva padrão de caseína foi feita para realizar os cálculos de determinação de proteínas solúveis totais.

3.5. Aminoácidos Aromáticos

A determinação de aminoácidos aromáticos seguiu o protocolo descrito por Nelson e Cox (2014). Foi pesado 0,05 g dos CMB e adicionado 5,0 mL de água deionizada, seguido de centrifugação a 3.000 rpm por 20 min (centrífuga Q222T – Quimis), diluições e leituras em espectrofotômetro (UV-visível Bel *Photonics UV-M51*) a 280 nm em cubeta de quartzo. Curva padrão de triptofano foi feita e utilizada para os cálculos de determinação de aminoácidos aromáticos.

3.6. Atividade Antioxidante

3.6.1. Atividade antioxidante utilizando DPPH

A atividade antioxidante foi determinada com o substrato DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) como descrito por Zhu et al. (2002), com modificações. Foi pesado 0,1 g dos CMB, adicionado 5,0 mL de etanol (99,8%) e colocado em ultrassom na frequência de 42 kHz (Cristófoli – CRI170-2) por 16 min. Após esse tempo, o sistema de reação foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 min (centrífuga Q222T – Quimis), seguido de coleta de 0,5 mL do sobrenadante da amostra; adição de 3 mL de etanol e 0,3 mL de solução de DPPH ($0,02 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ etanol 99,8%). A reação foi conduzida por 60 min no escuro a temperatura ambiente, seguido de leitura em espectrofotômetro (UV-visível Bel *Photonics UV-M51*) a 517 nm.

Para os resultados foi considerado o cálculo em Trolox Equivalente (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico, Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) e como porcentagem de DPPH reduzido, conforme Equação 1, sendo Abs as absorbâncias obtidas.

$$\% \text{ DPPH reduzido} = \frac{(\text{Abs Branco} - \text{Abs Amostra})}{\text{Abs Branco}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

3.6.2. Atividade antioxidante pela determinação da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade de superóxido dismutase foi determinada segundo a metodologia de Zhishen et al. (1999) e Beauchamp e Fridovich (1971). À 0,03 g dos dos CMB foram

adicionados 5 mL de tampão fosfato pH 7,8 (0,05 mol L⁻¹) seguido de retirada de uma alíquota de 0,05 mL. Esta alíquota foi adicionada a um tubo de ensaio ao qual foi acrescido 2 mL de tampão fosfato pH 7,8 (0,2 mol L⁻¹); 0,25 mL de NBT (nitroazul de tetrazólio); 0,2 mL de EDTA; 0,25 mL de metionina e 0,25 mL riboflavina. A reação foi conduzida no escuro, incubada em caixa de reação e deixado por 15 min com lâmpada de luz branca. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV-visível Bel *Photonics* UV-M51) a 560 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de ânion superóxido reduzido, conforme a Equação 2, sendo Abs as absorvâncias obtidas.

$$\% \text{ Superóxido reduzido} = \frac{(\text{Abs Branco} - \text{Abs Amostra})}{\text{Abs Branco}} \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Para todas as bioatividades e quantificação de moléculas foram feitos o branco da solução e o branco da amostra. O branco da solução continha a mesma quantidade de substrato e tampão; enquanto o branco da amostra continha a mesma quantidade de CMB e tampão, sem o substrato de reação. Ambos foram descontados dos resultados referentes às amostras.

Ao final das análises foram selecionados os CMB mais promissores, seguido da produção em massa, com mais biorreatores (Erlenmeyers e coletores universais), conforme descrito no item “3.2.”. Além disso, esses CMB foram caracterizados quanto ao pH e temperatura ótimos de atuação das enzimas, químico-bromatologicamente e quanto à citotoxicidade.

3.7. Caracterização dos CMB selecionados

3.7.1. Determinação do pH e temperatura ótimos das enzimas lipases, proteases, amilases e fitases

Para a determinação dos pHs ótimos das enzimas dos CMB selecionados, foram utilizadas as soluções tampão descritas a seguir com as molaridades utilizadas na determinação das atividades enzimáticas padrão (Tópicos 3.3.1; 3.3.2; 3.3.4.). Para os valores de pH de 4,0 e 5,0 utilizou-se tampão citrato-fosfato; de 6,0, 7,0 e 8,0 utilizou-se tampão fosfato de sódio; e 9,0 e 10,0 utilizou-se tampão bórico-boráx.

As temperaturas ótimas das enzimas foram determinadas incubando os sistemas reacionais a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C em banho-maria (Dubnoff – Nova Ética), em substituição à temperatura usada na determinação das atividades enzimáticas padrão (Tópicos 3.3.1; 3.3.2; 3.3.4.). Nesta determinação foram utilizados os pHs ótimo de cada enzima, correspondentes à atividade relativa de 100%.

3.7.2. Caracterização químico-bromatológica

As análises químico-bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia, no Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pertencente UNESP, campus Botucatu. Foram avaliadas matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), pH, proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), seguindo o protocolo AOAC (2000) e Silva e Queiroz (2006).

3.7.3. Citotoxicidade

A análise de citotoxicidade celular foi realizada no Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular (LaBio) - Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP. O protocolo utilizado foi o de Brackett et al. (2012) e Farquharson et al. (1993) com modificações estabelecidas por Athanázio-Heliodoro et al. (2018). Foi usado células de fibroblasto de camundongo (NIH-3T3) mantidas em DNEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementados com soro fetal bovino (10%), sulfato de estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e penicilina (100 U mL^{-1}), mantidas em estufa (37°C ; 5% de CO_2). Quando as células atingiram semi-confluência elas foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços em densidade 5.000 células por poço. As células foram submetidas por 24h com a presença dos CMb submetidos à extração alcoólica como descrita na atividade antioxidante. Foram utilizadas as proporções 10 μL do extrato:190 μL do meio; 20 μL do extrato:180 μL do meio; 30 μL do extrato: 170 μL do meio, com seis repetições cada. Os controles das amostras (etanol 99,8%) foram testados também nas três proporções. O controle positivo (Ctrl) consistiu no meio de cultivo convencional. Após o período de incubação o meio contido nas placas foi substituído por 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e novamente incubado em estufa (37°C ; 5% de CO_2) por 3h. O meio foi retirado e as células solubilizadas com dimetilsulfóxido para remoção do formazan formado, seguido de leitura a 570 nm com o auxílio de leitor de microplacas (leitor multi-modo Synergy-HTX, Biotek®). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade e comparados ao controle positivo.

3.8. Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata, com exceção da citotoxicidade que foi em sextuplicata e da análise químico-bromatológica que foi considerado as médias das duplicatas. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey (significativas $p \leq 0,05$) no Software R

versão 3.6.2. Para as análises químico-bromatológicas foram feitas o desvio das médias. Para a análise de citotoxicidade foi utilizado o Software *Prism 6* aplicados a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey (significativas $p \leq 0,05$).

4. Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados das atividades enzimáticas de lipases, proteases, amilases e fitases, bem como concentração proteica, aminoácidos aromáticos e atividade antioxidante dos CMb isolados e fermentados.

Quanto às atividades de lipases determinadas por titulometria destacaram-se os CMb DDGS + *A. niger* ($19,25 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e frit + *A. niger* ($11,61 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), os quais foram estatisticamente diferentes; entretanto, os demais tratamentos não tiveram diferença significativa entre eles. Observando a atividade lipolítica sobre p-NPP ($\text{U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) apenas os CMbs frit + *A. niger* (29,72) e DDGS + *A. niger* (35,16) apresentaram atividades (Tabela 1).

O CMb frit + *A. niger* ($22,67 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) apresentou atividade de protease superior aos demais. Outros CMbs fermentados como frit + *A. flavipes*, frit + *A. oryzae*, DDGS + *A. niger* e CMb de frit isolado apresentaram atividades de proteases semelhantes, no entanto, superiores ao CMb de DDGS isolado (Tabela 1).

Para a atividade de amilase ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) os únicos CMb que apresentaram atividades foram DDGS + *A. niger* e frit + *A. oryzae* (8,62 e 6,19, respectivamente), não tendo diferença estatística entre eles. CMb de DDGS isolado apresentou atividade, porém insignificativa quando comparado com os demais (Tabela 1).

Para a atividade de fitase ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) o CMb DDGS + *A. niger* (544,52) apresentaram o maior resultado numérico e igual estatisticamente ao CMb frit + *A. niger* (470,44). A atividade de fitase deste último foi estatisticamente igual aos CMb frit + *A. flavipes* (360,09) e frit + *A. oryzae* (360,09) (Tabela 1).

A maior concentração de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1}) foi determinada no CMb frit + *A. niger* (2,44), seguido do CMb DDGS + *A. niger* (1,36) com diferenças estatísticas. (Tabela 1).

Quanto aos aminoácidos aromáticos (U g^{-1}) todos os valores dos CMb foram distintos estatisticamente, sendo que o maior valor foi o CMb frit + *A. niger* (242,45), seguidos de frit + *A. oryzae* (182,45), CMb de frit isolado (143,66), frit + *A. flavipes* (104,66) e DDGS + *A. niger* (74,66). No CMb de DDGS isolado não foi detectada a presença de aminoácidos aromáticos pela metodologia proposta (Tabela 1).

A atividade antioxidante por DPPH ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) mostrou que houve diferenças entre os CMb frit + *A. niger* (16,12) com a maior atividade, seguido dos CMb DDGS + *A. niger* (15,14), frit + *A. oryzae* (14,39) e frit + *A. flavipes* (13,88). Estes dois últimos foram

iguais estatisticamente, seguidos pelo CMB de frit isolado (8,04) e CMB de DDGS isolado (5,27). A redução do DPPH foi maior quando utilizado o CMB frit + *A. niger*, reduzindo em torno de 72% do radical (Tabela 1).

A redução de ânions superóxido (%) mostrou diferença estatística sendo o CMB DDGS + *A. niger* (54,01) o maior, seguido de CMB frit + *A. flavipes* (45,78) e CMB frit + *A. niger* (41,90), estes dois últimos iguais estatisticamente, dando sequência em CMB frit + *A. oryzae* (29,04) que apresentou resultado semelhante ao CMB frit isolado (32,06) e, por último, o CMB DDGS isolado (10,47) (Tabela 1).

Não foi observado crescimento fúngico para os CMB DDGS + *A. flavipes* e DDGS + *A. oryzae*, por isso, foram descartadas das análises de bioatividades (Tabela 1).

Considerando todos os resultados obtidos foram selecionados os CMB frit + *A. niger* e o DDGS + *A. niger*, os quais foram produzidos em maior quantidade (Tabela 2).

Os resultados dos CMB selecionados que obtiveram diferença estatística foram para as atividades de amilase ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$), sendo que o CMB DDGS + *A. niger* apresentou maior valor (10,55) em relação ao CMB frit + *A. niger* (4,67); de fitase ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) onde o CMB frit + *A. niger* (935,15) foi superior ao CMB DDGS + *A. niger* (270,75); de aminoácidos aromáticos (U g^{-1}) em que o CMB frit + *A. niger* (155,45) foi maior do que o CMB DDGS + *A. niger* (109,59); e na redução de ânions superóxido (%) em que o CMB frit + *A. niger* (70,00) apresentou resultado superior ao CMB DDGS + *A. niger* (39,68%) (Tabela 2). As demais atividades não apresentaram diferença estatística.

Quanto à caracterização das enzimas dos CMB selecionados as lipases dos CMB fermentados apresentaram-se faixas de temperaturas ótimas semelhantes entre 20 a 80°C. O CMB frit + *A. niger* apresentou dois picos de pH ótimos, em 6,0 e 9,0, indicando a presença de isoenzimas; enquanto o CMB DDGS + *A. niger* apresentou pH ótimo em 7,0 (Figura 3).

Os CMbs fermentados apresentaram-se faixas de atividades de proteases ótimas nos diferentes pH e temperaturas avaliados, sem picos evidentes, com atividades relativas acima de 85% (Figura 4).

Ambos CMbs fermentados apresentaram pH ótimo para a atividade de fitase em 5,0; enquanto o CMB frit + *A. niger* apresentou faixa de temperatura ótima entre 50 a 70°C e o CMB DDGS + *A. niger* um pico a 50°C (Figura 5).

Quanto à análise químico-bromatológica (Tabela 3) foram obtidos os valores para os CMB frit + *A. niger* e CMB DDGS + *A. niger*, respectivamente, de MS 96,96% e 91,50%; PB 12,64% e 31,86%; e, EE 2,92% e 1,64%. Os valores de MM foram próximos em ambos os CMbs ($\approx 7\%$). Em relação as fibras para a FB os valores encontrados foram de 34,82% e 43,77% e FDN 59,38% e 64,37%, seguindo a mesma ordem dos CMB e FDA em torno de 42% para ambos.

Quanto à citotoxicidade não houve diferenças significativas entre os CMb isolados e fermentados em ambos os substratos analisados. Notou-se somente diferença com o controle da reação (Figura 6).

5. Discussão

A atividade de lipase determinada por titulometria foi maior nos CMb fermentados em relação aos isolados. O CMb frit + *A. niger* apresentou um aumento de 150 vezes e o CMb DDGS + *A. niger* de 490 vezes em relação aos seus respectivos CMb isolados, mostrando a eficiência da fermentação fúngica para a obtenção/produção dessa enzima. Pereira (2017) usando resíduos/subprodutos de laranja encontrou resultados de 19,1 U g⁻¹, sendo esse valor semelhante ao maior resultado encontrado no atual estudo.

Para a atividade de lipase em substrato sintético foram obtidos resultados apenas nos CMbs fermentados + *A. niger* com resultados similares com a utilização dos substratos frit e DDGS, mostrando a eficiência do fungo (*A. niger*) em produzir lipases. Fleuri et al. (2014) encontraram resultados de p-NPP de 0,24; 0,18 e 1,36 U g⁻¹ em substratos de farelo de trigo, farelo de soja e farelo de soja + bagaço de cana-de-açúcar, fermentados com *Aspergillus sp.* Singh et al. (2014) utilizaram *Schizophyllum commune* em FES com sementes de *Leucaena leucocephala* suplementadas e obtiveram resultados superiores (146,5 U g⁻¹) sobre p-NPP. Athanázio-Heliodoro et al. (2018) obtiveram também resultados superiores ao encontrado nesse trabalho, com o uso de frit de laranja e *A. niger* sendo de 300,43 U g⁻¹.

Novelli et al. (2016) obtiveram maior atividade proteolítica com o farelo de trigo e *A. flavipes* de 27,78 U g⁻¹, sendo aproximadamente 18% superior ao maior encontrado (CMb frit + *A. niger*).

A atividade de amilase encontrada no trabalho foi inferior ao encontrado em Almanaa et al. (2020) que utilizaram a FES com diferentes substratos da agroindústria e *Bacillus subtilis*. Os autores reportaram uma atividade de 670 U g⁻¹ com o farelo de trigo suplementado com amido. A combinação usada pelos autores do subproduto, micro-organismo e indutor pode ter contribuído para uma maior atividade amilásica (Babu e Satyanarayana, 1993; Tamamura et al., 2014; Arasu et al., 2019).

A atividade de fitase do CMb frit + *A. niger* foi 200 vezes superior comparado ao CMb frit isolado. O CMb DDGS + *A. niger* apresentou atividade de fitase superior ao de CMb frit com os outros fungos, enquanto o CMb isolado não apresentou atividade, demonstrando que a fermentação resulta em produção de fitase. Madeira et al. (2012) utilizando a FES de casca de laranja e *P. variotii* por 72h encontraram valores de 350 U g⁻¹, valor próximo aos obtidos com CMb frit + *A. oryzae* e *A. flavipes* nesse presente

estudo. Bala et al. (2014) realizaram FES com *Humicola nigrescens* com farelo de trigo e casca cítrica e obtiveram atividade de fitase de 48,2 e 13 U g⁻¹, respectivamente. Novelli et al. (2016) utilizando o farelo de trigo e *A. niger* 40018 obtiveram a atividade de fitase de 8.575 U g⁻¹, resultado superior ao encontrado no trabalho.

Observa-se resultados de atividades enzimáticas, a partir da literatura, superiores e/ou similares ao encontrado neste trabalho. Os trabalhos da literatura descritos acima focam na produção de, em geral, uma única enzima, cujas estratégias convencionais de maximização da produção enzimática são adotadas. No presente trabalho destaca-se a obtenção de múltiplas enzimas e outros compostos bioativos de maneira direta e indireta (FES) a partir de um processo único e utilizando resíduos e subprodutos agroindustriais, cujo produto pode ser utilizado na piscicultura.

Os aminoácidos aromáticos que foram avaliados neste estudo abordam principalmente a tirosina e triptofano, isto devido à metodologia utilizada (Nelson e Cox, 2014). O triptofano é um dos aminoácidos essenciais usados na alimentação de peixes para a formulação de sua dieta e sua deficiência pode causar prejuízos quanto ao seu desempenho e saúde (Cyrino et al., 2002). Os CMB fermentados mostraram-se superiores que o CMB isolado, sendo a magnitude de aumento do CMB frit + *A. niger* e CMB frit + *A. oryzae* de 69 e 27%, respectivamente. Para o CMB DDGS isolado não foi encontrada a presença de aminoácidos aromáticos, o que indica que a fermentação pode ser utilizada para aumentar a concentração de aminoácidos importantes nas dietas para peixes.

Para a atividade antioxidante os resultados foram maiores nos CMB fermentados em relação aos CMB isolados, sendo de até 100 vezes utilizando o substrato frit e de mais de 180 vezes para o substrato DDGS, demonstrando que o processo fermentativo foi capaz de aumentar esse potencial. Araújo et al. (2015) e Valente (2015) encontraram reduções dos radicais DDPH de 50 e 49% para folhas e polpa de laranja, respectivamente. Pardo (2016) obteve resultados superiores com o bagaço da laranja de 28 µmol mg⁻¹ utilizando a metodologia do sequestro do radical DPPH. Bier et al. (2019) também utilizaram a metodologia de DPPH para a FES com resíduo de laranja e *Diaporthe sp.* obtendo 41,5% de redução do radical, o que foi próximo ao CMB frit + *A. flavipes*.

A capacidade de redução de ânions superóxido demonstra a eficiência no combate a espécies reativas de oxigênio (EROs) em ser utilizada na alimentação de peixes, pois o SOD é a primeira linha de defesa antioxidante no organismo, sendo que catalisa a transformação do ânion superóxido (O₂⁻) em oxigênio (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Stagnaro-Green et al., 2011; Schneuer et al., 2012).

Em relação às caracterizações enzimáticas o CMb frit + *A. niger* apresentou lipases com faixa de pH ótimo em 6,0 e 9,0, enquanto o e CMb DDGS + *A. niger* também apresentou lipases com pH ótimo de 7,0. Liu et al. (2006) mostraram pH ótimo de 9,0 para a lipase bacteriana de *Burholderia sp.* Wang et al. (2008) obtiveram temperatura ótima na faixa de 25 a 50°C para lipases bacterianas de *Aureobasidium pullulans*. Okino-Delgado e Fleuri (2014) utilizando laranja da variedade Pêra encontraram pH ótimo na faixa de 6,0 a 8,0, sendo semelhante ao encontrado no presente trabalho e temperatura ótima de até 50°C. Singh et al. (2014) com o fungo *Schizophyllum commune* obteve resultados da atividade lipolítica na faixa de pH de 7,0 a 12,0, sendo o pH 11,0 como ótimo. Lipases produzidas por *Lactobacillus plantarum* apresentaram pH e temperaturas ótimas em pH 7,0 e 40°C, respectivamente (Torres et al., 2015); enquanto Pereira (2017) utilizando laranja Valência e Natal encontraram faixas ótimas de temperatura das lipases de 30 a 60°C para a primeira variedade e de 30 a 50°C para a segunda.

As proteases de ambos CMb apresentaram-se ampla faixa de temperatura ótima e pH ótimo (temperatura de 20 a 80°C e de pH de 4,0 a 10,0) mantendo atividades relativas acima de 85%. Com esses resultados há evidência de que essas enzimas não sofrem nenhuma degradação ou alteração de sua atividade enzimática em temperatura elevada (80°C) e em pH ácido ou básico, de 4,0 até 10,0. Yang e Lin (1998) utilizando *A. niger* e vinhaça fina de destilaria de arroz como substrato determinaram o pH 4,0 e temperatura de 30°C como ótimos. Proteases de origem vegetal como a papaína e bromelina possuem pH ótimo entre 5,0 e 9,0 e temperatura ótima em torno de 60°C (Rao, 1998).

O CMb frit + *A. niger* apresentou fitases com pH ótimo 5,0 e faixa de temperatura ótima entre 50 e 70°C, enquanto o CMb DDGS + *A. niger* apresentou o mesmo pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 50°C. A fitase apresentou resultado muito superior em pH 5,0 em ambos os CMb fermentados - na literatura existem trabalhos que afirmam que a enzima exógena produzida por *A. niger* é estável em pHs de 5,0 a 5,5 e temperatura de 55 a 58°C (Ullah e Gibson, 1987; Wyss et al., 1999; Greiner et al., 2009). Diferente das fitases fúngicas, as de vegetais possuem pH ótimos entre 3,0 e 8,0 (Greiner e Konietzny, 2006). Em relação as temperaturas ótimas para os CMb fermentados temos a presença de isoenzimas. Em 80°C observou-se desnaturação total da fitase do CMb DDGS + *A. niger*. Cao et al. (2007) afirmaram que a fitase de vegetais é totalmente inativada com temperaturas acima de 70°C.

Em relação às análises bromatológicas, a umidade do CMb frit + *A. niger* (9,5%) foi inferior quando comparada aos valores do frit isolado e por outros autores como no estudo Rezzadori e Benedetti (2009) com os valores médios de 82%. Para o CMb DDGS + *A. niger* a umidade foi de 3,0% sendo que na literatura encontra-se valores para o

substrato isolado de em torno de 10% (Tjardes e Wright, 2002). Assim, os valores apresentados neste estudo foram considerados aceitáveis para o uso bruto em dietas de animais, abaixo de 15%, pois valores acima disso apresentam o risco de deterioração (US Grains Council, 2012).

Para a matéria mineral os percentuais de cinzas das laranjas Valência ficam em torno de 0,4% (Taco, 2011). Pardo (2016) utilizando o bagaço da laranja fermentado com *Paecilomyces variotii* obteve um valor de 3,4% de MM, valores esses menores aos encontrados. Buosi (2017) avaliando DDGS de milho de diversas safras encontrou valores em torno de 2% de MM, isso mostra que o MM após a fermentação pode fazer com que aumente esse valor.

Pardo (2016) observou 10% de proteína bruta de fermentados com resíduos de laranja, sendo este valor aproximado ao encontrado no atual trabalho. Rivas et al. (2008) obteve valores de 6,5% nas cascas de laranja. Para o DDGS resultados de PB foram em torno de 30%, segundo Tjardes e Wright (2002), valores esses próximos ao encontrado no presente trabalho. Os valores de PB em fermentados podem diferenciar no conteúdo proteico, pois também são contabilizadas as estruturas dos fungos (Pardo, 2016), bem como os produtos proteicos por eles excretados.

As taxas de lipídeos da casca da laranja foram relatadas em Rivas et al. (2008) contendo 1,9%, valor próximo ao encontrado para o CMb frit + *A. niger* (1,6%); enquanto Tjardes e Wright (2002) relataram 9% para o DDGS de milho (valor esse superior ao CMb DDGS + *A. niger* 1,64%). Os micro-organismos têm a capacidade de degradar lipídeos pela ação enzimática, o que poderia explicar a menor concentração nos CMb fermentados (Fleuri et al., 2014).

Os valores encontrados na literatura de fibras solúveis e insolúveis para os resíduos de laranja variam de 23 e 22% (Van Soest, 1994) a 20,7 e 47,9% (Bortoluzzi e Marangoni, 2006). O CMb frit + *A. niger* apresentou valores superiores aos dos autores descritos. Para o DDGS isolado a concentração de fibra solúvel foi aproximadamente 42% - valor esse inferior ao CMb fermentado.

O uso dos CMb fermentados na análise do cultivo celular demonstrou uma redução em relação ao controle da célula fibroblasto NIH-3T3, sugerindo que a viabilidade da célula é inferior e modulando de forma negativa, mas não sendo tóxico. Em Pereira (2017) a viabilidade das células NIH-3T3 foi reduzida com o uso da casca da laranja das variedades Hamlin, Valência e Natal.

6. Conclusões

Os complexos multibioativos compostos por DDGS e frit fermentados com *Aspergillus niger* destacaram-se comparado aos isolados e fermentados com outros

fungos, por isso podem ser recomendados para a alimentação de peixes como aditivos devido ao aumento do conteúdo enzimático, proteico, aminoacídico e de antioxidantes. Além disso, o fato de terem sido caracterizados bioquimicamente, químico-bromatologicamente e não serem citotóxicos para a célula NIH-3T3, são condizentes para aplicação na piscicultura.

7. Perspectivas

O uso do complexo multibioativo pode ser aplicado em campo, para que sejam avaliados os impactos na alimentação de peixes no desempenho animal, digestibilidade e imunomodulação. Futuramente podem ser realizadas análises de citotoxicidade com outras linhagens de células que sejam pertencentes ao trato-digestório de peixes.

Referências Bibliográficas

- ALMANAA, T. N.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; ALYAHYA, S. A. Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. **Journal of King Saud University – Science**, v. 23, n. 2, p. 1555-1561, 2020.
- ARASU, M.V.; AROKIYARAJ, S.; VIAYARAGHAVAN, P.; KUMAR, T. S. J.; DURAIKANDIAN, V.; AL-DHABI, N. A.; KAVIYARASU, K. One step green synthesis of larvicidal, and azo dye degrading antibacterial nanoparticles by response surface methodology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 190, p. 154-162, 2019.
- ARAÚJO, E. I. M.; MONTEIRO, L. C. C. F.; OLIVEIRA, A. M. S.; ALVES, L. A.; BERTINI, L. M. Caracterização da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* de *Citrus sinensis* L. (Laranja). **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, 2015.
- ATHANAZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO, C. H.; FERNANDES, C. J. C.; ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z.; SILVA, R. A.; FACANALI, R.; ZAMBUZZI, W. F.; MARQUES, M. O. M.; FLEURI, L. F. Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 14, p. 1-9, 2018.
- BABU, K. R.; SATYANARAYANA, T. Parametric optimizations for extracellular α -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* B49. **Folia Microbiol**, v. 38, p. 77-80, 1993.
- BALA, A.; JAIN, J.; KUMARI, A.; SINGH, B. Production of an extracellular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid state fermentation and its application in dephytinization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 259-264, 2014.
- BEAUCHAUMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assay and applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- BIER, M. C. J.; MEDEIROS, A. B. P.; DE KIMPE, N.; SOCCOL, C. R. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe sp.* **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 168-176, 2019.
- BORTOLUZZI, R. C.; MARANGONI, C. Caracterização da fibra dietética obtida da extração do suco de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 1, p. 61-66, 2006.
- BRACARENSE, A. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 313-321, 2014.
- BRACKETT, M. G.; LEWIS, J. B.; KIOUS, A. R.; MESSER, R. L.; LOCKWOOD, P. E.; BRACKETT, W. W.; WATAHA, J. C. Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 7, p. 1729-1735, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteinage binding. **Analitical Biochemistry** v. 72, p. 248–254, 1976.

BUOSI, J. P. F. Composição bromatológica e digestibilidade in vitro de grãos secos de destilaria com solúveis. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Brasil. Descalvado-SP, 2017.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259-272, 2005.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 678-684, 2015.

CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.497-507, 2007.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501–505, 1947.

CYRINO, J. E. P.; CONTE, L.; CASTAGNOLLI, M. C. Mini-curso: criação de peixes em tanques-rede. In: **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**. 12. São Paulo: ABRAq. p. 60, 2002.

FARQUHARSON, C.; WHITEHEAD, C. C.; RENNIE, J. S.; LOVERIDGE, N. In vivo effect of 1, 25-dihydroxycholecalciferol on the proliferation and differentiation of avian chondrocytes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 9, p. 1081-1088, 1993.

FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; PEDROSA, V. A.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P.; NOVELLI, P. K.; DELGADO, C. Exploration of Microorganisms Producing Bioactive Molecules of Industrial Interest by Solid State Fermentation. In: LIMA, G.P.P.; VIANELLO, F. **Food Quality, Safety and Technology**. 1 ed.: Springer-Verlag Wien, v. 1, p. 147-161, 2013.

FLEURI, L. F.; NOVELLI, P. K.; DELGADO, C. H. O.; PIVETTA, M. R.; PEREIRA, M. S.; ARCURI, M. L. C.; CAPOVILLE, B. L. Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 2585–2591, 2014.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; BOSCOLO, W. R.; CYRINO, J. E. P.; FURUYA, V. R. B.; FEIDEN, A. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for food application. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.44, n.2, p.123-140, 2006.

GREINER, R.; PATTERSON, L.; MILLER, O. Motivations, risk perceptions and adoption of conservation practices by farmers. **Agricultural Systems**, v. 99, p. 86–104, 2009.

GUIMARÃES, L. C.; FERNANDES, A. P.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 43-47, 2014.

IQBAL, Z.; KHAN, S. I.; JAN, M. N. S.; IQBAL, M.; DIN, Z.; ALAM, Z.; ALAM, S. S.; SAIFULLAH. Phytotoxic, cytotoxic and antimicrobial effect of the organic extract of *Aspergillus niger*. **International Journal of Biosciences**, v. 6, n. 10, p. 90-96, 2015.

JÁCOME, M. C. M. B. Uso do resíduo industrial de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) para obtenção de produtos biotecnológicos. **Tese** (Doutorado) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W.; MOHAMAD, R.; GOH, Y. M.; SHOKRYAZDAN, P. Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativo e enzimáticos**. 1ª ed, São Paulo: Editora Edgard Blücher, p. 593, 2001.

LIU, C. H.; LU, W. B.; CHANG, J. S. Optimizing lipase production of *Burkholderia sp.* by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1940– 1944, 2006.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp.* **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 28, p. 90–95, 1997.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. v. 13. Pearson, 2017.

MADEIRA, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 3, p. 477-482, 2012.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHADE, D. V. Pro-duction of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORA-JAÍMES, G.; BÁCENA-GAMA, R.; MENDOZAMARTÍNEZ, G. D.; GONZÁLES-MUÑOZ, S. S.; HERRERAHARO, J. G. Respuesta productiva y fermentación ruminal em borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilasas. **Agrociência**, v.36, p.31-39, 2002.

MORALES, G. A.; MOYANO, F. J.; MARQUEZ, L. In vitro assessment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract. **Animal Feed Science and Technology**, v. 170, p. 209-221, 2011.

MOURA, G. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; LANNA, E. A. T. Desempenho e atividade de lipase em tilápias do Nilo. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 235, p. 367-374, 2012.

MUNIR, K.; MAQSOOD, S. A review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production. **Journal of Food and Agriculture**, Abu Dhabi, v.25, n.1, p.66-80, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.

NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.139-143, 2006.

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103–107, 2014.

OLIVEIRA, G. R.; LOGATO, P. V. R.; FREITAS, R. T. F. Digestibilidade de nutrientes em rações com complexo multienzimático para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1945-1952, 2007.

PARDO, F. A. S. Extração de compostos fenólicos com potencial bioativo a partir de bagaço industrial de laranja seco e biotransformado usando CO₂ supercrítico. **Dissertação** (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2016.

PEREIRA, J. O.; DE SOUZA, A. Q. L.; DE SOUZA, A. D. L.; DE CASTRO FRANÇA, S.; DE OLIVEIRA, L. A. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. In: de Azevedo J., Quecine M. (eds) **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham. p. 71-103, 2017.

PEREIRA, M. S. Resíduos de laranja como fonte de enzimas e compostos bioativos. **Dissertação** (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Botucatu-SP, 2017.

RAHMAN, A. N. A.; ELHADY, M.; SHALABY, S. I. Efficacy of the dehydrated lemon peels on the immunity, enzymatic antioxidant capacity and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**. v. 505, p. 92-97, 2019.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 597-635, 1998.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. In: **International Workshop Advances in Cleaner Production**. São Paulo: UNIP, p. 1-11, 2009.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 2380-2387, 2008.

SAXENA, R.; SINGH, R. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus sp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1334-1342, 2011.

SCHNEUER, F. J.; NASSAR, N.; TASEVSKI, V.; MORRIS, J. M.; ROBERTS, C. L. Association and predictive accuracy of high TSH serum levels in first trimester and adverse pregnancy outcomes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 9, p. 3115-3122, 2012.

SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 977-983, 2010.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV –Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciências Tecnológicas de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 805-811, 2007.

SINGH, M. K.; SINGH, J.; KUMAR, M.; THAKUR, I. S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 92–99, 2014.

STAGNARO-GREEN, A.; ABALOVICH, M.; ALEXANDER, E.; AZIZI, F.; MESTMAN, J.; NEGRO, R.; NIXON, A.; PEARCE, E. N.; SOLDIN, O. P.; SULLIVAN, S.; WIERSINGA, W. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. **Thyroid**, v. 21, n. 10, p. 1081-1125, 2011.

STOCKMANN, C.; LOSEN, M.; DAHLEMS, U.; KNOCKE, C.; GELLISSEN, G.; BÜCHS, J. Effect of oxygen supply on passing, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tubes cultures. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 195-205, 2003.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP- NEPA- Universidade Estadual de Campinas, 2011.

TAMAMURA, N.; SABURI, A.; MUKAI, N.; MORIMOTO, T.; TAKEHANA, S.; KOIKE, H.; MATSUI, H.; MORI, K. Enhancement of hydrolytic activity of thermophilic alkalophilic α -amylase from *Bacillus sp.* AAH-31 through optimization of amino acid residues surrounding the substrate binding site. **Biochemical Engineering Journal**, v. 86, p. 8-15, 2014.

TJARDES, K.; WRIGHT, C. Feeding Corn Distiller's Co-Products to Beef Cattle. **Animal & Range Sciences**, n. 2036, p. 1–5, 2002.

TORRES, M.; MANCHEÑO, J. M.; RIVAS, B.; MUÑOZ, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 246–252, 2015.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia** - 12ª Edição. Artmed Editora, 2016.

ULLAH, A. H. J.; GIBSON, D. M. Extracellular phytase (E. C. 3. 1. 3. 8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. **Preparative Biochemistry**, v. 17, p. 63–91, 1987.

US Grains Council. **A guide to Distiller's Dried Grains with Solubles (DDGS)**, U.S. Grains Council DDGS User Handbook – 3. Ed. Washinton DC, USA, 2012.

VALENTE, D. M. C. Pesquisa da atividade antioxidante em subprodutos alimentares. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock Publ. Assoc, 1994.

WANG, J.; LIU, Z.; WANG, Y.; CHENG, W.; MOU, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 445–451, 2008.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RÉMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G.; LEHMANN, M.; VAN LOON, A. P. G. M. Biochemical characterization of fungal phyatses (myo-inositol hexakisphos-phate phosphohydrolases): catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 367–373, 1999.

YANG, F. C.; LIN, I. H. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 397-402, 1998.

ZANUTTO-ELGUI, M. R.; VIEIRA, J. C. S.; PRADO, D. Z.; BUZALAF, M. A. R.; PADILHA, P. M.; OLIVEIRA, D. E.; FLEURI, L. F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. **Food Chemistry**. V. 278, p. 823-831, 2019.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

ZHU, Q. Y.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 692–699, 2002.

<p align="center">4. TÍTULO DO PROJETO Obtenção e caracterização de complexos multibioativos obtidos a partir de resíduo e subproduto visando aplicação como aditivos na piscicultura</p>		<p>3. INTERVENÇÃO Obtenção inovadora de produto multibioativo e caracterizado para inserir na alimentação de peixes.</p>		
<p align="center">1. JUSTIFICATIVA Obtenção de NOVO complexo multibioativo contendo enzimas, proteínas (e seus aminoácidos) e antioxidantes, não tóxico, caracterizado bioquimicamente e bromatologicamente.</p>	<p align="center">6. PRODUTO Produto inovador de baixo custo e toxicidade contendo enzimas, proteínas, aminoácidos, antioxidantes e outros macronutrientes.</p>	<p align="center">8. PESSOAS E RESPONSABILIDADES Execução: Andressa G. dos Santos; Colaboração técnica: Dafne A. Camargo e Milene S. Pereira; Orientações: Luciana F. Fleuri e Margarida M. Barros. Parcerias: JBT Food Tech por Daniela Kharfan e Cereale ; Financiamento: CNPq</p>	<p align="center">11. PREMISSAS As características do resíduo e subproduto são suscetíveis às condições climáticas e de manejo; Mudanças de mercado e legislação podem precificá-los; Fungos podem mutar e alterar a produção das biomoléculas.</p>	<p align="center">12. RISCOS Interrupção do financiamento; Desistência das pessoas envolvidas; Avarias gerais na estrutura laboratorial; Pandemias.</p>
<p align="center">5. OBJ SMART Obter de resíduos/subprodutos e destes combinados com fungos por fermentação lipases, proteases, fitases, amilases, proteínas, aminoácidos e antioxidantes, bem como apresentar produtos selecionados e caracterizados, em 30 meses.</p>				<p align="center">13. CUSTOS Bolsa de mestrado, aquisição de materiais de consumo e conserto de materiais permanentes, bem como pagamento de serviço de terceiros.</p>
<p align="center">2. BENEFÍCIOS (ODS 2, 3, 9, 14 e 17)* Obtenção inovadora de complexo multibioativo caracterizado por bioprocessos simples, sustentáveis e custo-efetivos; Parcerias entre universidade (incluindo de grupos de pesquisa), empresas e instituição de fomento à pesquisa; Capacitação concomitante de recursos humanos com troca produtiva de conhecimentos científicos.</p>	<p align="center">7. REQUISITOS Micro-organismos; Resíduos de laranja (frit) e de milho (DDGs); Infraestrutura laboratorial; Materiais de consumo e permanente; Recurso humano e equipe previamente treinada; Orientação específica em bioprocessos.</p>	<p align="center">9. AÇÕES Manter e repicar fungos; Obter e processar resíduo e subproduto; Fermentar resíduo e subproduto com fungos; Determinar as biomoléculas em todos os produtos resultantes; Selecionar produtos mais promissores; Caracterizar bioquimicamente, e quanto à citotoxicidade; Coletar, analisar e apresentar dados.</p>	<p align="center">10. GRUPO DE ENTREGAS Encontros semanais com a orientadora e bimestrais com a co-orientadora para avaliação e condução dos experimentos; Confecção de documento de qualificação e dissertação; Publicação de resumo e artigo científico.</p>	<p align="center">14. CONTRAPARTIDA Estrutura laboratorial pré-existente; equipe de recursos humanos qualificados; publicações precedentes ao projeto relativas à temática.</p>

Figura 1. Canvas da Pesquisa intitulada “Obtenção de complexos multibioativos a partir de resíduo e subproduto e caracterização visando aplicação como aditivos na piscicultura”. ODS= Objetivos do Desenvolvimento Sustentável, sendo que 2 engloba “Agricultura Sustentável”, 3 “Saúde e Bem-Estar”, 9 “Indústria, Inovação e Infraestrutura”, 14 “Vida na Água” e 17 “Parcerias e Meios de Implementação”.

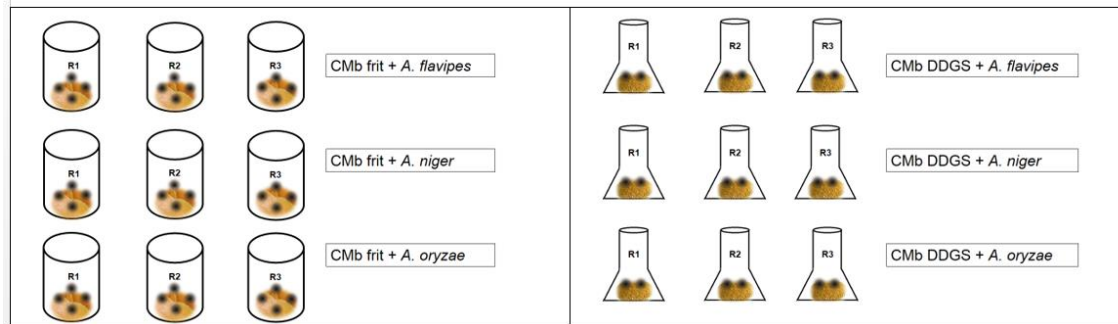


Figura 2. Representação ilustrativa do delineamento experimental do Complexo Multibioativo (CMB). R1 – repetição 1; R2 – repetição 2; R3 – repetição 3.

Tabela 1. Atividades biológicas e quantificação de biomoléculas dos Complexos multibioativos (Cmb) isolados e fermentados.

Cmb	Lipase por Titulometria (U g ⁻¹ min ⁻¹)	Lipase em #PNP-palmitato (U g ⁻¹ min ⁻¹)	Protease (U g ⁻¹ min ⁻¹)	Amilase (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	Fitase (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	Proteínas Solúveis Totais (mg mL ⁻¹)	Aminoácidos Aromáticos (U g ⁻¹)	Trolox Equivalente (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	Redução DPPH (%)	Redução ânion superóxido (%)
Frit* + <i>A. flavipes</i>	2,97±0,85 ^c	0,00 ^b	12,00±2,29 ^b	0,00 ^b	360,09±35,99 ^b	0,31±0,13 ^c	104,66±0,64 ^d	13,88±0,20 ^c	47,14±2,25 ^c	45,78±3,03 ^b
Frit* + <i>A. niger</i>	11,61±1,07 ^b	29,72±1,90 ^a	22,67±2,02 ^a	0,00 ^b	470,44±57,78 ^{ab}	2,44±0,33 ^a	242,45±2,90 ^a	16,12±0,10 ^a	72,27±1,08 ^a	41,90±0,92 ^b
Frit* + <i>A. oryzae</i>	5,66±0,88 ^c	0,00 ^b	11,00±1,00 ^b	6,19±0,70 ^a	360,09±46,02 ^b	0,65±0,19 ^c	182,45±3,85 ^b	14,39±0,17 ^c	52,86±1,88 ^c	29,04±2,24 ^c
DDGs ^{''} + <i>A. niger</i>	19,25±3,07 ^a	35,16±5,10 ^a	12,67±2,36 ^b	8,62±1,15 ^a	544,52±104,44 ^a	1,36±0,10 ^b	74,66±1,96 ^e	15,14±0,18 ^b	59,09±2,07 ^b	54,01±1,85 ^a
Frit*	4,53±0,25 ^c	0,00 ^b	13,83±1,04 ^b	0,00 ^b	156,01±40,36 ^c	0,41±0,02 ^c	143,66±9,82 ^c	8,04±0,36 ^d	25,11±2,55 ^d	32,06±0,63 ^c
DDGs ^{''}	3,26±0,25 ^c	0,00 ^b	2,00±0,50 ^c	0,18±0,15 ^b	0,00 ^c	0,02 ^d	0,00 ^f	5,27±0,25 ^e	6,00±1,78 ^e	10,47±2,84 ^d

*Médias que apresentam letras iguais indicam diferenças estatísticas não significativas (p>0,05). Letras representam os testes comparativos entre os Cmb referente a cada coluna. *Frit de laranja; ''DDGs (grãos de destilaria com solúveis de milho); #p-nitrofenil-palmitato. Não foi observado crescimento fúngico para os Cmb DDGS + *A. flavipes* e DDGS + *A. oryzae*, por isso, foram descartadas dos processos de análise de bioatividades e/ou concentração de moléculas.

Tabela 2. Atividades biológicas e quantificação de biomoléculas dos Complexos Multibioativos (CMB) fermentados por *Aspergillus niger* em frit de laranja e DDGS de milho, selecionados e produzidos em massa.

CMB	Lipase por Titulometria (U g ⁻¹ min ⁻¹)	Lipase em #PNP-palmitato (U g ⁻¹ min ⁻¹)	Protease (U g ⁻¹ min ⁻¹)	Amilase (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	Fitase (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	Proteínas Solúveis Totais (mg mL ⁻¹)	Aminoácidos Aromáticos (U g ⁻¹)	Trolox Equivalente (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	Redução DPPH (%)	Redução ânion superóxido (%)
Frit + <i>A. niger</i>	8,49±0,42 ^a	14,58±3,43 ^a	26,50±8,19 ^a	4,70±0,90 ^b	935,15±45,86 ^a	0,46±0,07 ^b	155,45±10,10 ^a	12,43±0,40 ^a	34,11±4,24 ^a	70,00±1,91 ^a
DDGS + <i>A. niger</i>	7,36±0,98 ^a	25,23±2,04 ^a	18,17±3,33 ^a	10,55±0,80 ^a	270,75±53,03 ^b	0,68±0,02 ^a	109,59±3,24 ^b	11,43±0,75 ^a	24,22±7,89 ^a	39,68±1,11 ^b

*Médias que apresentam letras iguais indicam diferenças estatísticas não significativas (p>0,05). Letras representam os testes comparativos entre os Cmb referente a cada coluna. #p-nitrofenil-palmitato.

Tabela 3. Caracterização bromatológica dos Complexos Multibioativos (CMb) fermentados por *Aspergillus niger* em frit de laranja e DDGS de milho. As siglas MS – Matéria Seca; PB – Proteína Bruta; EE – Extrato Etéreo; MM – Matéria Mineral ou Cinzas; FB – Fibra Bruta; FDN - Fibra de Detergente Neutro; FDA – Fibra de Detergente Ácida.

CMb	pH	% MS	% PB	% EE	% MM	% FB	% FDN	% FDA
Frit + <i>A. niger</i>	5,11	91,50	12,64	2,92	6,86	34,82	59,38	42,77
DDGS + <i>A. niger</i>	5,61	96,96	31,86	1,64	6,70	43,77	64,37	42,34

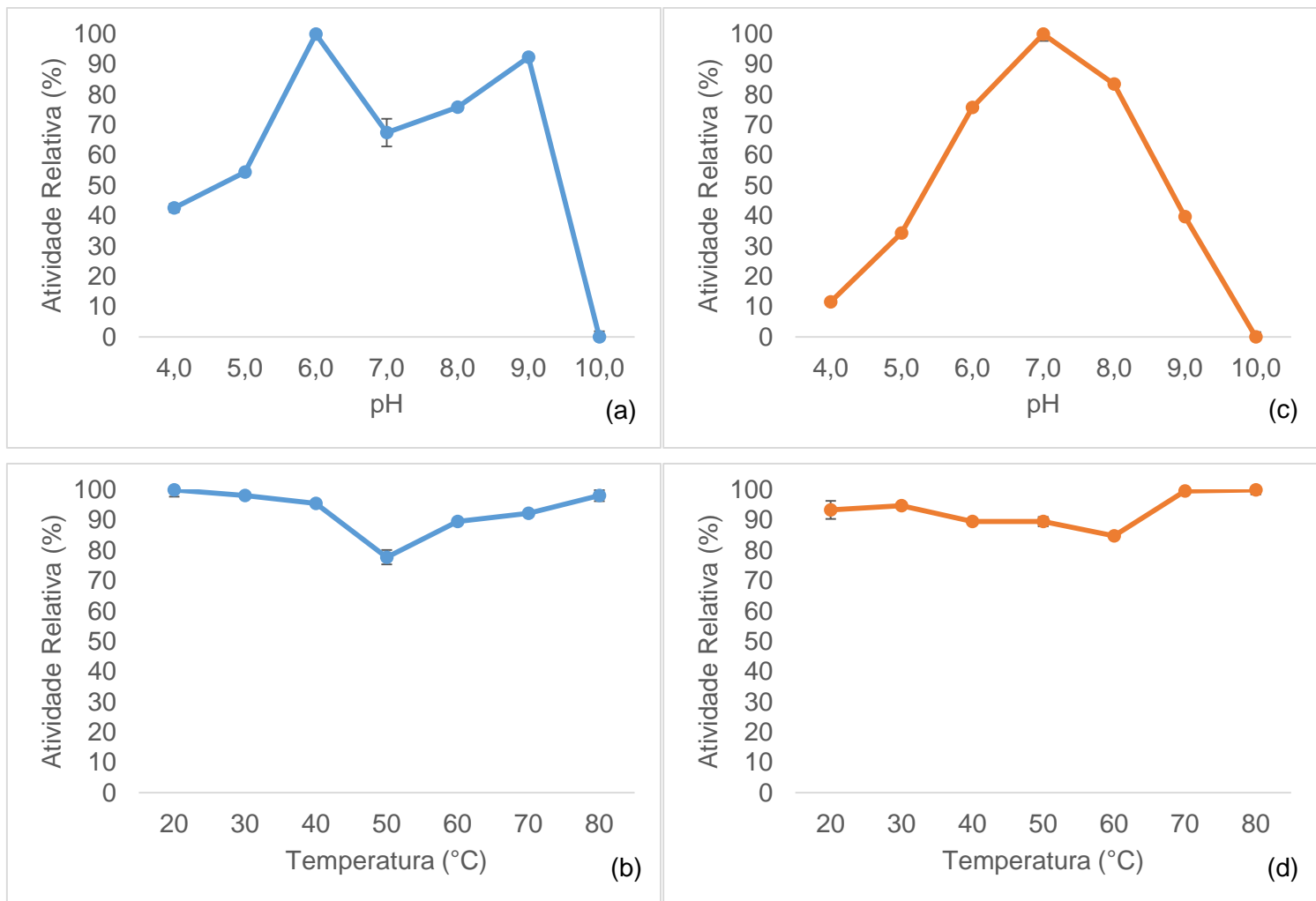


Figura 3. Influência do pH e temperatura nas atividades de lipases, determinadas em p-nitrofenil-palmitato, dos Complexos Multibioativos (CMb) fermentados por *Aspergillus niger* em frit de laranja (a e b, respectivamente) e DDGS de milho (c e d, respectivamente).

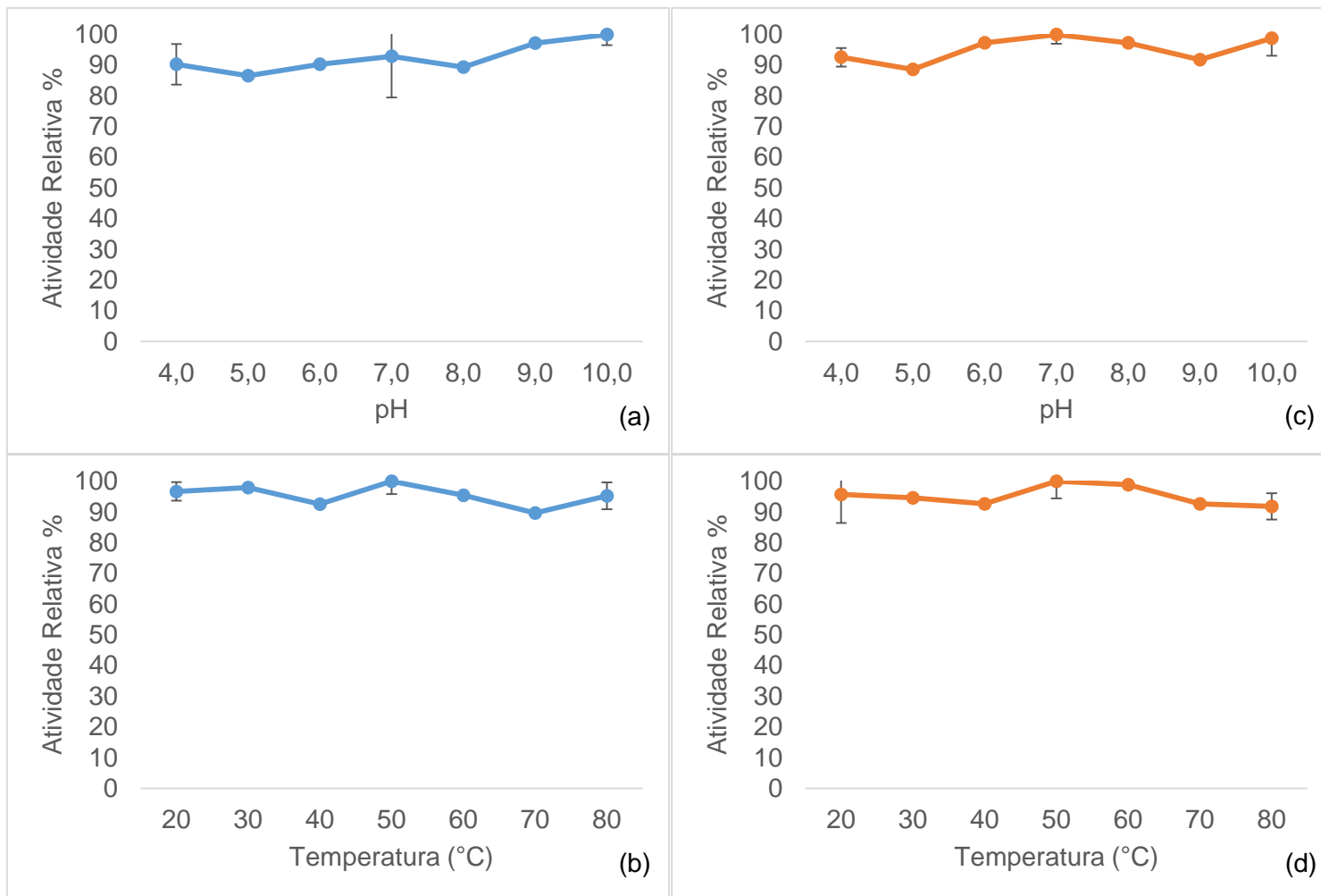


Figura 4. Influência do pH e temperatura nas atividades de proteases dos Complexos Multibioativos (CMb) fermentados por *Aspergillus niger* em frit de laranja (a e b, respectivamente) e DDGS de milho (c e d, respectivamente).

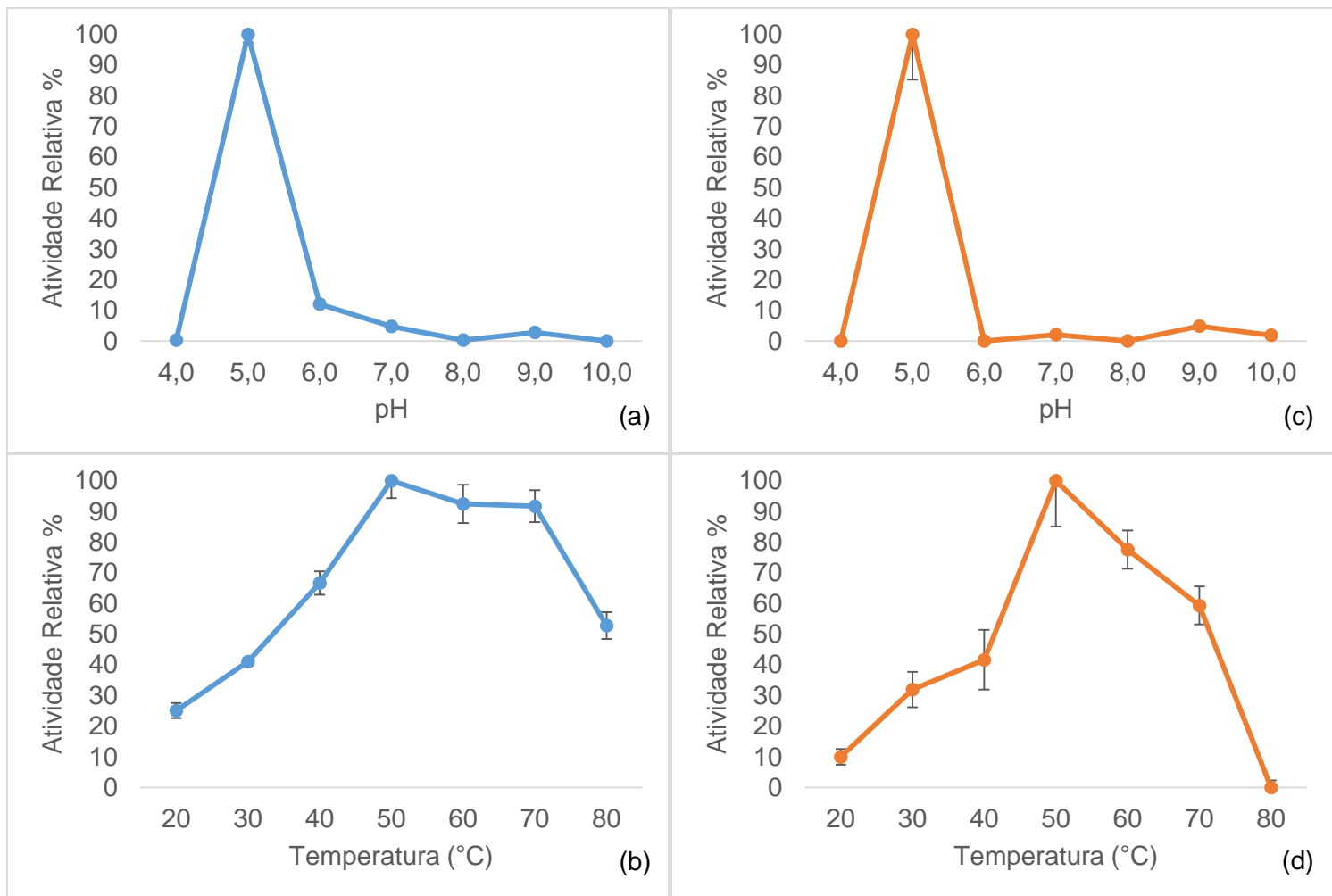


Figura 5. Influência do pH e temperatura nas atividades de fitases dos Complexos Multibioativos (Cmb) fermentados por *Aspergillus niger* em frit de laranja (a e b, respectivamente) e DDGS de milho (c e d, respectivamente).

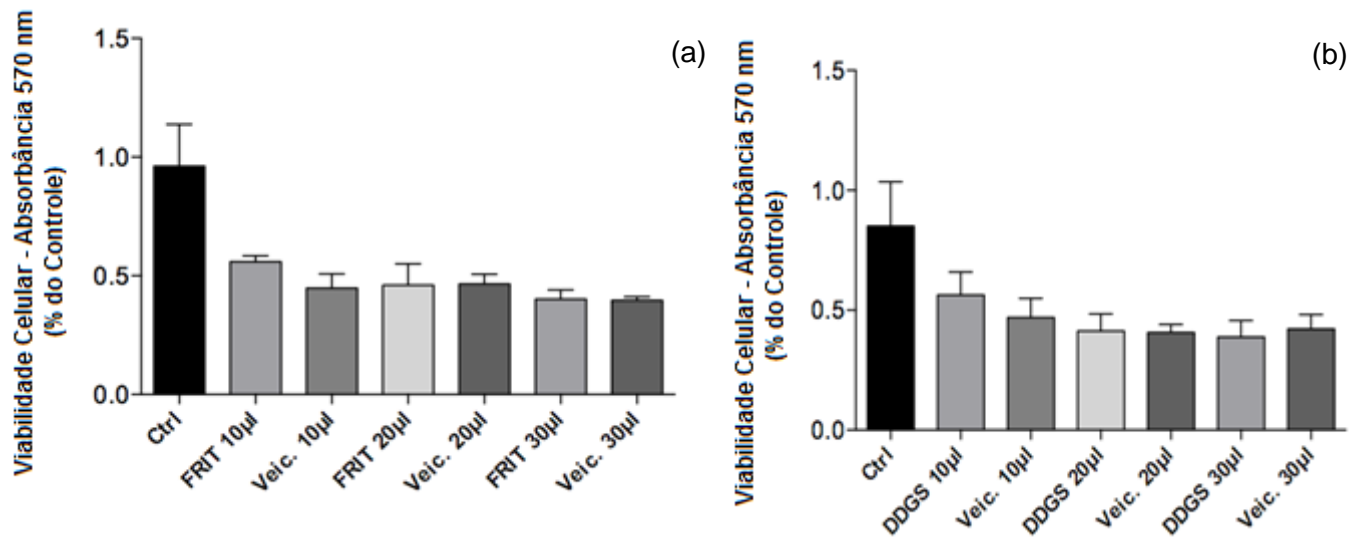


Figura 6. Viabilidade da célula NIH-3T3 em teste com os Complexos Multibioativos (CMb) fermentados por *Aspergillus niger* em frit de laranja (a) e DDGS de milho (b).