

BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS E COMPOSTOS ATIVOS A PARTIR DE RESÍDUOS DE LARANJA ISOLADOS E FERMENTADOS VISANDO A APLICAÇÃO EM COSMÉTICOS

Milene Stefani Pereira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutora em Biotecnologia.

BOTUCATU- SP

2023



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Bioprospecção de moléculas e compostos ativos a partir de
resíduos de laranja isolados e fermentados visando a
aplicação em cosméticos**

Milene Stefani Pereira

Orientadora: Prof^a Associada Luciana Francisco Fleuri

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutora em Biotecnologia.

BOTUCATU- SP

2023

AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente à Deus por todas as oportunidades oferecidas e por me capacitar para cada conquista.

Aos meus pais Rose e Júlio por todo o amor, incentivo e dedicação.

Ao meu irmão Giovanni por sempre torcer por mim.

Ao meu noivo Cauê por todo amor, carinho e compreensão.

À minha orientadora Profa Dra Luciana Fleuri por todo o conhecimento, amizade e carinho, nessa parceria de pelo menos 10 anos de trabalho.

Ao meu grupo de pesquisa do Laboratório de Bioprocessos, vocês me ensinaram muito.

À Profa Dra Giuseppina Pace Pereira Lima por todo carinho, atenção e colaboração, um prazer imenso trabalhar com você.

Ao Prof Dr Willian Fernando Zambuzzi pela atenção e por disponibilizar todos os recursos do seu laboratório.

Aos servidores do departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências.

Ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Vegetais Pós-Colheita e Biotecnologia de Espécies Vegetais coordenado pela Professora Doutora Giuseppina Lima.

Ao Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular Integrada coordenado pelo Professor Doutor Willian Zambuzzi.

À empresa JBT Food Tech por ceder os resíduos de laranja brutos utilizados no presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), pelo espaço para o desenvolvimento do meu trabalho e as demais experiências profissionais vividas.

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	8
I – Revisão Bibliográfica.....	10
1. Correlação da biotecnologia, agroindústria e cosméticos	10
2. Resíduos de laranja.....	13
3. Fermentação em Estado Sólido (FES).....	16
4. Biomoléculas e compostos bioativos aplicados em cosméticos.....	18
4.1. Proteínas e Aminoácidos	19
4.2. Aminas biogênicas	30
4.3. Polifenóis.....	39
5. CONCLUSÃO.....	42
II – Objetivos	44
1. Objetivo geral	44
1.1. Objetivos específicos.....	44
III – Materiais e Métodos	45
1. Preparo e obtenção das amostras	45
1.1. Obtenção das amostras a partir dos resíduos de laranja.....	45
1.2. Conservação das linhagens fúngicas	46
2. Determinação de aminoácidos aromáticos	46
3. Determinação de proteínas solúveis totais	47
4. Atividades enzimáticas	47
4.1. Determinação da atividade de protease.....	47
4.2. Determinação da atividade de lipase por titulometria.....	47
4.3. Determinação das atividades de lipase por espectrofotometria em substratos sintéticos.....	48
4.4. Determinação da atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	49
5. Determinação de aminas biogênicas	49
5.1. Extração de aminas biogênicas	49
5.2. Perfil de aminas biogênicas dos resíduos de laranja isolados e fermentados	
50	
6. Extração e determinação de compostos fenólicos	51
6.1. Determinação de fenóis totais	51
6.2. Determinação de flavonoides totais	51

7.	Determinação das atividades antioxidantes	52
7.1.	ABTS – [2,2' Azino-bis (3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico)]	52
7.2.	DPPH – (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	52
7.3.	FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power	52
7.4.	MDA – Malonaldeído	53
8.	Viabilidade e Adesão Celular - Citotoxicidade	53
9.	Determinação da expressão gênica em fibroblastos (FP96)	54
10.	Análise estatística	54
IV	– Resultados e Discussões	56
1.	Aminoácidos aromáticos, proteínas solúveis totais e atividade de protease	56
2.	Atividades de lipase	61
3.	Atividade de SOD	65
4.	Aminas biogênicas e aminoácidos precursores	66
5.	Compostos fenólicos	75
6.	Avaliação dos resíduos de laranja isolados e fermentados em testes <i>in vitro</i> de atividade biológica	78
6.1.	Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	79
6.2.	Teste de citotoxicidade – viabilidade celular	85
6.3.	Expressão do gene COL1A1 em fibroblastos	90
7.	Conclusão e perspectivas	91
	Referências	93

Lista de Figuras

Figura 1. Resumo gráfico.	9
Figura 2. Definições botânicas e industriais dos resíduos do processamento da laranja para a obtenção do suco da fruta.	15
Figura 3. Obtenção das amostras isoladas e fermentadas a partir dos resíduos de laranja.	45
Figura 4. Atividade de lipase dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	61
Figura 5. Atividade de lipase em substrato sintético p-NPP dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> sp.....	63
Figura 6. Atividade de lipase em substrato sintético p-NPB dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> sp.....	64
Figura 7. Atividade de SOD dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	65
Figura 8. Teor de fenóis totais dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	76
Figura 9. Flavonoides totais dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	77
Figura 10. Atividade antioxidante, determinada com o radical ABTS, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	80
Figura 11. Atividade antioxidante, determinada com o radical DPPH, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	81
Figura 12. Atividade antioxidante, determinada pelo método FRAP, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	83
Figura 13. Atividade antioxidante, determinada pelo método MDA, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	84
Figura 14. Citotoxicidade pelo teste MTT em fibroblastos humanos (FP96) tratados com os resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de <i>Aspergillus</i> sp.....	87
Figura 15. Viabilidade e adesão celular por cristal violeta (CV) de fibroblastos humanos (FP96) tratados com os resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de <i>Aspergillus</i> sp.	88
Figura 16. Níveis de expressão do gene COL1A1 em fibroblastos humanos tratados com resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> sp...	90

Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentração de aminoácidos aromáticos, proteínas solúveis totais e atividade de protease nos resíduos de laranja isolados e fermentados.....	57
Tabela 2. Determinação de aminoácidos precursores nos resíduos de laranja isolados e fermentados.	67
Tabela 3. Determinação de monoaminas nos resíduos de laranja isolados e fermentados.	68
Tabela 4. Determinação de diaminas nos resíduos de laranja isolados e fermentados..	69
Tabela 5. Determinação de poliaminas nos resíduos de laranja isolados e fermentados.	71
Tabela 6. Determinação do índice de qualidade das aminas biogênicas dos resíduos de laranja isolados e fermentados.....	74

Resumo

O Brasil ocupa o quarto lugar à nível mundial no ranking de consumo de cosméticos o que faz com que as indústrias do ramo se aperfeiçoem cada vez mais, em especial quanto à substituição de insumos sintéticos por naturais. Essa premissa ressalta a importância de pesquisas para a obtenção de ingredientes e ativos sustentáveis, o que pode ser atendido, em parte, pelo uso de resíduos agroindustriais e aplicação de bioprocessos. Nosso país é líder mundial na produção e exportação do suco de laranja, resultando em expressiva geração de resíduos. Assim, neste trabalho, resíduos de laranja foram utilizados de forma isolada e como substrato para fermentação em estado sólido (FES) com diferentes espécies de *Aspergillus* sp., e realizadas a bioprospecção de aminoácidos aromáticos, proteínas solúveis, proteases, lipases, superóxido dismutases, aminas biogênicas (e seu perfil) ácidos fenólicos e flavonoides. Ademais, todos os resíduos foram testados quanto à ação antioxidante por diferentes métodos e citotoxicidade para fibroblastos (FP96) *in vitro* com checagem da expressão de COL1A1 (responsável pela produção de colágeno, uma das proteínas alvo no mercado cosmético). O bagaço fermentado com *A. oryzae* apresentou a maior concentração (7,75 mg/g) de aminoácidos aromáticos. As maiores concentrações de proteínas solúveis totais foram observadas no bagaço fermentado com *A. flavipes* (141,04 mg/g) e no frit fermentado com *A. oryzae* (135,13 mg/g). A casca fermentada com *A. oryzae* (8.771,7 U/g) apresentou a maior atividade de protease, enquanto as maiores atividades de lipase foram obtidas no bagaço isolado (19,25 U/g), na casca isolada (21,51 U/g) e no frit fermentado com *A. niger* (24,06 U/g). A maior atividade específica da enzima SOD foi 447,79 U/mg com o bagaço fermentado com *A. oryzae*, que também apresentou as maiores concentrações de fenóis totais (967,76 mg AGE/100g). No entanto, para flavonoides totais as maiores concentrações foram no frit fermentado com *A. niger* (1.027,73 mg QE/100g) e com *A. oryzae* (1.130,44 mg QE/100g). Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e MDA e não apresentaram citotoxicidade para fibroblastos (FP96) *in vitro* nas concentrações de 6,25 e 12,5 mg/ml. Os fibroblastos tratados com os resíduos foram capazes de expressar o gene COL1A1, no entanto, não aumentaram a expressão do gene em relação ao grupo controle. Os resíduos de laranja isolados e fermentados, são potenciais fontes de diferentes biomoléculas e compostos ativos que podem ser usados como ingredientes ativos naturais em produtos cosméticos.

Palavras-chave: antioxidantes, *Aspergillus* sp., enzimas, frit, polifenóis.

Abstract

Brazil is fourth in the cosmetics consumption ranking, which means that the cosmetic industries are improving more and more, especially in terms of replacing synthetic inputs with natural ones. This premise underscores the importance of research to obtain sustainable ingredients and actives, which can be met, in part, using agro-industrial residues and the application of bioprocesses. World leader in the production and export of orange juice, Brazil has significant waste generation. Thus, in this work, orange residues were used in isolation and as substrate for solid state fermentation (SSF) with different species of *Aspergillus* sp., and bioprospecting of aromatic amino acids, soluble proteins, proteases, lipases, superoxide dismutases, biogenic amines (and their profile) phenolic acids and flavonoids. In addition, all residues were tested for antioxidant action by different methods and cytotoxicity for fibroblasts (FP96) in vitro by checking the expression of COL1A1 (responsible for collagen production, one of the target proteins in the cosmetic market). The bagasse fermented with *A. oryzae* showed the highest concentration (7.75 mg/g) of aromatic amino acids. The highest concentrations of total soluble proteins were observed in bagasse fermented with *A. flavipes* (141.04 mg/g) and in frit fermented with *A. oryzae* (135.13 mg/g). The peel fermented with *A. oryzae* (8,771.7 U/g) showed the highest protease activity, while the highest lipase activities were obtained in the isolated bagasse (19.25 U/g), in the isolated peel (21.51 U /g) and in the fermented frit with *A. niger* (24.06 U/g). The highest specific activity of the SOD enzyme was 447.79 U/mg with the bagasse fermented with *A. oryzae*, which also showed the highest concentrations of total phenols (967.76 mg AGE/100g). However, for total flavonoids the highest concentrations were in the fermented frit with *A. niger* (1,027.73 mg QE/100g) and with *A. oryzae* (1,130.44 mg QE/100g). All samples showed antioxidant activity by ABTS, DPPH, FRAP and MDA methods and did not show cytotoxicity for fibroblasts (FP96) in vitro at concentrations of 6.25 and 12.5 mg/ml. The fibroblasts treated with the residues were able to express the COL1A1 gene, however, they did not increase the expression of the gene in relation to the control group. Isolated and fermented orange residues are potential sources of different biomolecules and active compounds that can be used as natural active ingredients in cosmetic products.

Keywords: antioxidants, *Aspergillus* sp., enzymes, frit, polyphenols.

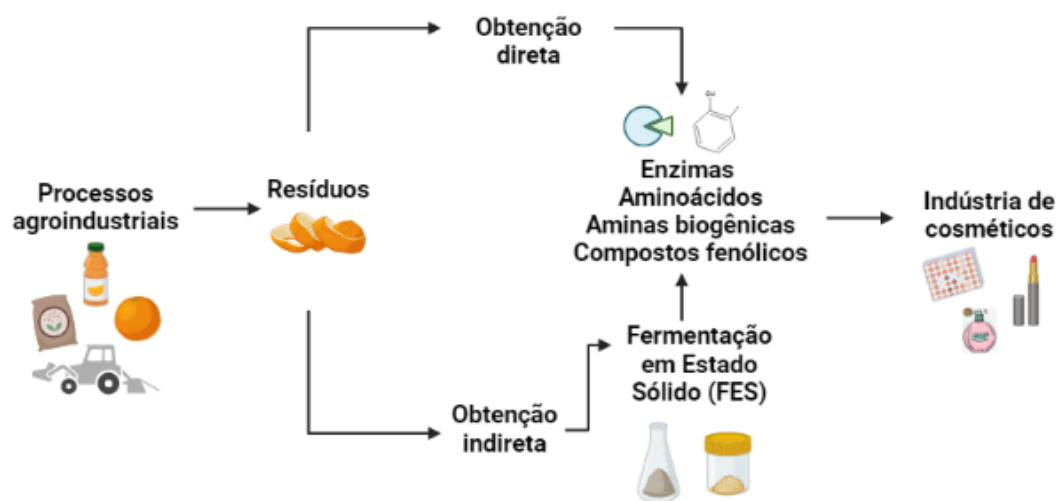


Figura 1. Resumo gráfico.

(Imagem criada em: www.biorender.com)

I – Revisão Bibliográfica

1. Correlação da biotecnologia, agroindústria e cosméticos

A biotecnologia aponta as aplicações dos conhecimentos e técnicas das ciências biológicas para o desenvolvimento de tecnologias, processos e produtos. Os bioprocessos, uma das ferramentas da biotecnologia, pode englobar a obtenção de um produto a partir de um organismo vivo, o qual aproveita matérias-primas orgânicas por meio de reações bioquímicas utilizando sistemas biológicos ou seus derivados. Além disso, o desenvolvimento de ciência aplicada pode conectar a esfera acadêmica e governamental gerando progresso econômico, inovação e bem-estar social (BARRAGÁN-OCAÑA *et al.*, 2020; COSSAR, 2011).

Nos últimos anos, houve interesse expressivo na produção de produtos biotecnológicos sustentáveis por bioprocessos, estimulando o uso de insumos derivados da agricultura ou outras fontes renováveis de origem biológica (BARRAGÁN-OCAÑA *et al.*, 2020; SCHÜGERL; HUBBUCH, 2005).

Esse interesse acompanha a transição de uma economia linear para uma economia circular, que é definida por modelos de reaproveitamento e reciclagem de recursos naturais, para alcançar o desenvolvimento sustentável, reduzir os impactos ao meio ambiente, lidar com os desafios futuros de demandas de matérias-primas e crescimento econômico (TISCINI *et al.*, 2021).

Anualmente a agroindústria gera cerca de 2,0 bilhões de toneladas de resíduos sólidos orgânicos em todo o mundo, com estimativa que o número aumente para 3,4 bilhões de toneladas até 2050 (KHORAIRI *et al.*, 2021; KAZA *et al.*, 2018).

O Brasil é um dos países mais ricos em recursos naturais, um dos maiores produtores agrícolas e o segundo maior exportador agrícola do mundo e, por consequência, um dos maiores geradores de resíduos (AZEVEDO *et al.*, 2022; RUVIARO *et al.*, 2020; JEBLI; YOUSSEF, 2019).

Gerenciar os resíduos agroindustriais de forma adequada é essencial não apenas para preservar o meio ambiente, mas também para obter produtos com potencial de uso, e conseqüentemente, retorno econômico (KHORAIRI *et al.*, 2021) e social. Essa premissa corrobora com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU) da Agenda 2030. O ODS 12, por exemplo, trata do consumo e produção sustentáveis e traz no inciso 12.2 como meta específica, alcançar

a gestão sustentável e o uso eficiente dos recursos naturais e no inciso 12.5 reduzir substancialmente a geração de resíduos por meio da economia circular e suas ações de prevenção, redução, reciclagem e reuso de resíduos (IPEA, 2022).

Outras iniciativas públicas como ESG (*Environmental, Social and Governance*) ou, em português, Governança Ambiental, Social e Corporativa, vêm sendo implementadas nas companhias, em resposta à conscientização e cobrança da população quanto à promoção do desenvolvimento de ações que contemplam o cuidado com o meio ambiente, o desenvolvimento da cultura de responsabilidade social e a adoção de melhores práticas de governança (GRUPO NEW SPACE, 2021).

Nesse contexto, a biotecnologia pode ser o fator preponderante para transformação desse cenário e tem auxiliado a indústria de cosméticos na descoberta, desenvolvimento e produção de ativos para novas formulações e novos produtos (ALVAREZ *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2020).

O mercado global de cosméticos foi avaliado em US\$ 380,2 bilhões em 2019 e deve atingir US\$ 463,5 bilhões até 2027 (CHOUHAN *et al.*, 2021).

O Brasil ocupa o quarto lugar como maior consumidor mundial de cosméticos, sendo que as vendas de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC), mesmo sob os impactos da pandemia, mantiveram a tendência de alta em 2019 (3,9%) e em 2020 (4,7%), atingindo R\$ 122,408 bilhões, segundo a Euromonitor Internacional (ABIHPEC, 2021).

Entre as tendências de consumo que vêm impulsionando esse aumento das vendas no setor, os consumidores de cosméticos estão em busca de produtos sustentáveis, que reforcem a economia circular, a exigência sobre a procedência das matérias-primas e ingredientes naturais, além da crescente demanda por certificações de rótulo como *vegan* (vegano), *cruelty-free* (livre de crueldade), orgânico e outros (COSMETIC INNOVATION, 2021).

Essas demandas podem ser constatadas pelas cifras contabilizadas e descritas no relatório da *Future Market Insights* (Percepções de Mercados Futuros) em que o faturamento do setor de cosméticos orgânicos e naturais foi de US\$ 18,7 bilhões em 2021 (COSMETIC INNOVATION, 2021), com previsão de receita de US\$ 79,6 bilhões até 2033 (FUTURE MARKET INSIGHTS, 2023).

No Brasil, o mercado de cosméticos naturais tem crescido 20% ao ano, movimentando cerca de R\$ 3 bilhões, e o resultado é o franco crescimento de empresas nacionais de cosméticos sustentáveis (SEBRAE, 2023).

A procura por produtos sustentáveis e com as características renováveis de matérias-primas naturais deu origem a um novo termo denominado de “*Circular Beauty*” ou em livre tradução, Beleza Circular, que incentiva e promove o processo de transformar subprodutos, resíduos ou biomassa descartados em novos ingredientes ou produtos da indústria de cosméticos (LEDESMA, 2022; DINI; LANERI, 2021).

Reforçando esse contexto, as políticas que promovem a energia renovável e os produtos de base biológica aumentaram a importância das matérias-primas de biomassa e das moléculas bioativas que podem ser obtidas delas. Segundo a FAO, cerca de 45% dos vegetais e frutas produzidos são perdidos ou descartados (FAO, 2019), sendo esses resíduos ricos em proteínas, açúcares e minerais, bem como, considerados como substratos promissores para a produção de moléculas bioativas a partir de bioprocessos, como a fermentação (CAMARGO *et al.*, 2022; SAVINO *et al.*, 2021).

Assim, o descarte de alimentos representa uma valiosa fonte de materiais para a criação de cosméticos naturais e orgânicos reciclados. Ademais, as parcerias entre produtores de alimentos e empresas de cosméticos representam uma possibilidade para incorporar resíduos como ingredientes ativos preciosos para a aplicação cosmética no ciclo produtivo (LEDESMA, 2022; DINI; LANERI, 2021).

Essas premissas sugerem uma nova abordagem para os resíduos agroindustriais, como a criação de uma biorrefinaria, que poderia integrar os descartes orgânicos a outros processos que dariam origem a novos produtos (OSORIO *et al.*, 2021). López *et al.* (2010), por exemplo, propuseram a ideia de uma biorrefinaria para os resíduos de laranja, considerando países que têm grande produção do fruto, como o caso do Brasil que atualmente é líder na produção de laranja para suco (CITRUSB, 2022). Autores relatam que biomoléculas podem ser recuperadas desses descartes e que esse cenário representa oportunidades com viés econômico para o desenvolvimento de soluções eficientes e sistemas sustentáveis (OSORIO *et al.*, 2021; LÓPEZ *et al.*, 2010).

As diferentes moléculas e compostos bioativos obtidos de frutos cítricos são amplamente conhecidos e utilizados na indústria cosmética. A utilização de resíduos cítricos para a formulação de cosméticos é permitida e considerada segura pelo Painel de

Especialistas para Segurança de Ingredientes Cosméticos (Panel), que avaliou cerca de 47 ingredientes derivados de cascas de *Citrus* sp. que podem compor produtos cosméticos. Os extratos de *Citrus sinensis*, especificamente, estão registrados como ingredientes no Programa de Registro Voluntário de Cosméticos (VCRP) da *Food and Drug Administration* (FDA), em livre tradução Administração de Alimentos e Medicamentos, agência federal de regulamentação dos Estados Unidos (BURNETT *et al.*, 2021).

Metodologias biotecnológicas, como fermentação e síntese enzimática têm sido fundamentais na produção de cosméticos como ingredientes biologicamente ativos que conferem propriedades de renovação celular, antioxidante, anti-inflamatória, antienvhecimento e fotoprotetora (ADDI *et al.*, 2022; BURNETT *et al.*, 2021; ALVAREZ *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2020).

Portanto, a partir do exposto a correlação da biotecnologia, agroindústria e cosméticos é clara e promissora, o que incentivou a presente pesquisa e revisão.

Desta forma, adiante está descrito e discutido as possíveis biomoléculas que podem ser obtidas dos resíduos de laranja isolados ou utilizados em bioprocessos, como a fermentação em estado sólido, com vistas às aplicações cosméticas e reforço da economia circular.

2. Resíduos de laranja

O gênero *Citrus*, membro da família Rutaceae, inclui várias espécies representadas por laranjas, laranjas agrídoces, limão, tangerinas e tangores, denominadas de frutas cítricas, estão entre as principais culturas frutíferas do mundo. E devido as suas características nutricionais são utilizadas para consumo *in natura* e processamento (ADDI *et al.*, 2022).

Entre as quais, a laranja é a principal representante, sua produção mundial oscilou entre 68 e 76 milhões de toneladas anuais entre 2011 a 2019, o que representa cerca de 8,5% do total da produção de frutos, sendo as principais formas de comercialização o suco *in natura* (AHMED *et al.*, 2021; FAO, 2021).

A cultura da laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), por exemplo, tem importante valor econômico no Brasil, a safra esperada para a temporada de 2022/2023 é de 13 milhões de toneladas de laranjas e cerca de 82% do total de sua produção é

destinada para a produção industrial do suco de laranja (CITRUSBR, 2022; FUNDECITRUS, 2022).

O Brasil é o maior fornecedor de suco de laranja do mundo. Segundo a Comex Stat em 2020, as exportações de FCOJ – *Frozen Concentrate Orange Juice*, termo industrial em inglês para Suco de Laranja Concentrado e Congelado, superaram US\$ 1,4 bilhões. De acordo com as estimativas, 79% de todo suco de laranja comercializado no mundo são de laranjas brasileiras, sendo esse produto classificado como uma *commodity* agrícola (CITRUSBR, 2022; FUNDECITRUS, 2022; FAEG, 2021; JEBLI; YOUSSEF, 2019).

O processamento industrial do suco de laranja é, majoritariamente, realizado pela extratora *in line* da JBT Food Tech, a qual é responsável pelo processamento de cerca de 75% dos sucos cítricos produzidos no mundo. O processo é mecânico, confere características uniformes em escala global para os resíduos gerados e o permite a conservação das atividades das biomoléculas e compostos biativos que possam estar presentes (JBT FOOD TECH, 2022; OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2016).

No processo industrial de obtenção do suco de laranja aproximadamente 43% da fruta se torna resíduo (OKINO-DELGADO *et al.*, 2019). As laranjas são fontes de polifenóis, terpenóides, vitaminas (A, C e E), minerais (cálcio, potássio e magnésio), carotenoides, fibras e enzimas (lipases e proteases) - características de composição que podem ser estendidas, total ou em parte, aos resíduos da fruta, tornando-os fontes nobres de compostos que podem ser recuperados e reaproveitados (ADDI *et al.*, 2022; ATOLANI *et al.*, 2020; BERK, 2016; CAMARGO *et al.*, 2022; LÓPEZ *et al.*, 2010 OKINO-DELGADO; FLEURI, 2016; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2014).

A possibilidade de recuperação de compostos bioativos de resíduos industriais de uma cadeia de produção de grandes dimensões como do processamento do suco de laranja, torna-se atraente do ponto de vista geográfico, econômico e sustentável, e requer mais estudos para compreensão de como esses fatores podem se alinhar e gerar novos produtos (OSORIO *et al.*, 2021; JEBLI; YOUSSEF, 2019; LÓPEZ *et al.*, 2010).

Três frações residuais industriais distintas são geradas: o frit (fragmento externo da casca), a casca e o bagaço (Figura 2). Cada fração tem características específicas e, por isso, são destinadas a diferentes usos. O frit é principalmente direcionado para a

obtenção de óleos essenciais e a casca e o bagaço são encaminhados para a recuperação da pectina e em parte para alimentação animal. No entanto, essas aplicações consomem pouco do montante de resíduos gerados e apresentam baixo valor de mercado nos contextos de destinos apresentados (OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; BERK, 2016; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2016; LÓPEZ *et al.*, 2010).

Os resíduos de laranja, conforme a literatura científica tradicional, costumam ser classificados somente como casca e bagaço, entretanto, trabalhos recentes trouxeram a abordagem dos resíduos obtidos do processo industrial (CAMARGO *et al.*, 2022; FRANCISCO *et al.*, 2019; OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; ATHANÁZIO-HELIODORO *et al.*, 2018; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2016; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2014).

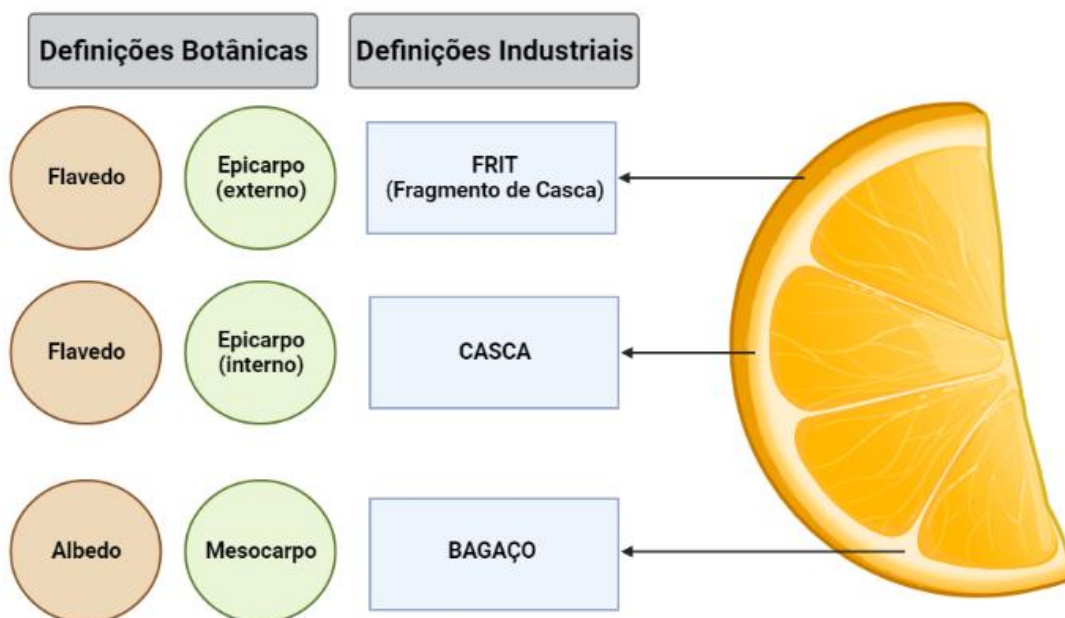


Figura 2. Definições botânicas e industriais dos resíduos do processamento da laranja para a obtenção do suco da fruta.

(Imagem criada em: www.biorender.com)

Quanto à obtenção de produtos a partir de resíduos é importante observar sua composição bioquímica conforme cada fração.

López *et al.* (2010), por exemplo, descreveram a composição bioquímica da casca de laranja que contém açúcares solúveis, amido, fibras (celulose, hemicelulose, lignina e

pectina), cinzas, gorduras, proteínas e ácidos orgânicos. Esse relato corroborou com os dados obtidos por Camargo *et al.* (2022), que definiram a composição bromatológica das frações residuais industriais da laranja (bagaço, casca e frit) separadamente. No entanto, foi observado que as frações têm quantidades distintas de cada composto, provavelmente, devido às diferenças morfológicas e papéis fisiológicos que desempenham no desenvolvimento e conservação do fruto, inferindo presença e concentração de moléculas e compostos bioativos diferenciados (PEREIRA *et al.*, 2020; OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2016).

Considerando que resíduos e suas frações são geradas em abundância, são fontes diretas de nutrientes e compostos bioativos, e suas utilizações podem ser ampliadas para várias finalidades, a fermentação em estado sólido (FES) surge como alternativa viável de utilização desses resíduos como fonte de carbono, substrato para o crescimento de microrganismos, e potenciais precursores e indutores para obtenção de metabólitos visando a produção de produtos biotecnológicos.

3. Fermentação em Estado Sólido (FES)

A FES é um bioprocessamento que permite a produção de moléculas e compostos bioativos por meio do crescimento de microrganismos em substratos sólidos, os quais podem ser usados tanto como suporte físico, quanto como fonte de nutrientes em um ambiente com ausência de água livre (SAVINO *et al.*, 2021).

Os substratos empregados na FES, geralmente, são resíduos ou subprodutos agroindustriais, fato que direciona os descartes excedentes e confere característica sustentável ao método e reforça as premissas da economia circular (PRADO *et al.*, 2019).

Por meio da FES é possível obter metabólitos como enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, surfactantes e compostos aromáticos. Atualmente a ampla gama de aplicações desses metabólitos têm inferido interesse e direcionado pesquisas para a valorização das biomassas inexploradas e/ou pouco exploradas (LIZARDI-JIMÉNEZ; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2017).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são microrganismos que podem ser utilizados na FES (ŠELO *et al.*, 2021), no entanto, os fungos se adaptam melhor ao bioprocessamento, devido às suas características fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas que os permitem crescer em substratos sólidos como pedaços de madeira, sementes, caules, raízes, frutos e matérias orgânicas no geral (ŠELO *et al.*, 2021; BHARGAV *et al.*, 2008).

Os fungos mais comumente empregados na FES são dos filos Ascomycota e Basidiomycota (ŠELO *et al.*, 2021).

Fungos filamentosos possuem grande potencial para a produção de diversos compostos bioativos por FES, sendo que o gênero *Aspergillus* sp., representante do filo Ascomycota, é conhecido por ser amplamente utilizado nesse processo fermentativo e por produzir diferentes enzimas e compostos bioativos (KUMAR *et al.*, 2021; ŠELO *et al.*, 2021; EL-HAWARY *et al.*, 2020; LIZARDI-JIMÉNEZ; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2017; BHARGAV *et al.*, 2008).

As espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são as mais utilizadas em FES, relacionadas especialmente à produção de enzimas como amilases, celulasas, fitases, lipases, pectinases, proteases, tanases, entre outras (CAMARGO *et al.*, 2022; MEINI *et al.*, 2021; KUMITCH *et al.*, 2020; PRADO *et al.*, 2019). Ademais, também foram descritos como produtores de metabólitos secundários e compostos antioxidantes (KUMAR *et al.*, 2021; EL-HAWARY *et al.*, 2020), sendo que o gênero *Aspergillus* sp. já foi descrito como produtor de surfactantes (BORAH *et al.*, 2021) e ácido kójico (SAEEDI *et al.*, 2019) que são aplicados a indústria de cosméticos. Já a espécie *Aspergillus flavipes* foi descrita por produzir diferentes biomoléculas por FES, a saber: proteases (MANFREDINI *et al.*, 2021; ZANUTTO-ELGUI *et al.*, 2019; NOVELLI *et al.*, 2016), queratinases (EL-AYOUTY *et al.*, 2012), metionina gama-liases (EL-SHORA *et al.*, 2021; EL-SAYED, 2011), pectinases e xilanases (TORRES-BARAJAS *et al.*, 2020; WOLF-MÁRQUEZ *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-TRUJILLO *et al.*, 2011), lovastatina (DAUD *et al.*, 2020; PRASANNALATHA; HEMALATHA, 2015), peptídeos bioativos (MANFREDINI *et al.*, 2021; ZANUTTO-ELGUI *et al.*, 2019), ácido indol-3-acético (PRADO *et al.*, 2019), flavoproteínas e antioxidantes (EL-SAYED *et al.*, 2012).

Além dos substratos mais comuns utilizados em FES como as culturas de cereais como farelo de trigo, farelo de soja e casca de arroz, houve o aumento na utilização de resíduos de frutas como substratos, objetivando maximizar a utilização dos recursos naturais, aproveitar integralmente os resíduos de frutas e obter novas moléculas e compostos bioativos (OKINO-DELGADO *et al.*, 2022; KUMITCH *et al.*, 2020; ATHANÁZIO-HELIODORO *et al.*, 2018; BHARGAV *et al.*, 2008).

Os resíduos de laranja já foram documentados como substrato para FES na obtenção lipases (ATHANÁZIO-HELIODORO *et al.*, 2018; OKINO-DELGADO;

FLEURI, 2014), proteases, fitases (CAMARGO *et al.*, 2022) e de polifenóis (XUE *et al.*, 2022).

Assim, a utilização de resíduos agroindustriais, incluso os cítricos, para a obtenção de biomoléculas e compostos bioativos reforça a economia circular proposta pelas metas da Agenda 2030 e reforça a obtenção de bioprodutos em alternativa aos sintéticos por meio de bioprocessos (IPEA, 2022; KHORAIRI *et al.*, 2021; BARRAGÁN-OCAÑA *et al.*, 2020; SADH *et al.*, 2018; SAGAR *et al.*, 2018) que podem ser aplicados na produção de cosméticos.

4. Biomoléculas e compostos bioativos aplicados em cosméticos

Biomoléculas são compostos de carbono com grande variedade para ligantes de diferentes grupos funcionais, e podem, inclusive, apresentar dois ou mais tipos de grupos funcionais, cada qual com suas características químicas e reacionais. A atividade biológica, ou seja, a funcionalidade de uma molécula é determinada pela química de seu grupo funcional e pela sua disposição no espaço tridimensional, bem como, sua classificação como biomolécula (NELSON; COX, 2014).

As quais, podem ser subdivididas em metabólitos primários e secundários. Os primários são denominados de " pilar da vida", incluem aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios. Presentes na organização de todos os seres vivos e de seus processos metabólicos como crescimento, desenvolvimento e reprodução. Apresentam bioatividade, como combate a radicais livres, por exemplo (RAJALAKSHMIA *et al.*, 2023).

Os metabólitos secundários são produzidos por grupos restritos como plantas e microrganismos e estão associados a funções específicas para a vida da planta, como proteção contra patógenos e predadores, produção de aromas e cores característicos (NELSON; COX, 2014).

É comum que esses compostos específicos, produzidos não só pelas plantas, mas também por microrganismos e alguns grupos de animais, sejam classificados como compostos bioativos (GUAADAUI *et al.*, 2014). O termo "bioativo" no contexto científico pode ser interpretado como "biologicamente ativo", que causa efeito, reação, resposta direta sobre organismo ou tecido vivo e que pode ser positivo ou negativo dependendo da substância, da dose ou da biodisponibilidade (GUAADAUI *et al.*, 2014; CAMMACK *et al.*, 2006).

Os compostos bioativos são representados por diferentes classes de biomoléculas como os flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, micotoxinas e pigmentos, os quais podem apresentar diferentes ações biológicas (HEAT *et al.*, 2022; SADH *et al.*, 2018).

Assim, pesquisar biomoléculas e compostos bioativos de resíduos agroindustriais de laranja com potenciais aplicações em cosméticos representa uma área que pode ser explorada e/ou expandida.

4.1. Proteínas e Aminoácidos

Proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todas suas partes (NELSON; COX, 2014). Desempenham papéis importantes em diferentes processos biológicos e podem atuar como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores e muitas outras funções (ZAIA *et al.*, 1998).

A diversidade das funções proteicas, em primeira análise, é dada pelos aminoácidos que as constituem, os quais são unidos entre si por ligações peptídicas. Os aminoácidos apresentam um carbono alfa ligado covalentemente a um hidrogênio (H), um grupo carboxila (COOH), um grupo amino (NH₂) e um radical, que varia para cada um dos 20 aminoácidos descritos como constituintes estruturais de proteínas (ÖZOGUL; ÖZOGUL, 2020; OSHIMURA; SAKAMOTO, 2017).

Dentre os diferentes grupos de aminoácidos possíveis, os aminoácidos aromáticos, cuja classe é integrada pelo L-triptofano (Trp), L-fenilalanina (Phe) e L-tirosina (Tyr). Estes são diferenciados pela cadeia lateral composta por estruturarem com anel aromático (NELSON; COX, 2014).

Os aminoácidos aromáticos são os produtos da via biossintética do ácido chiquímico (chiquimato), rota metabólica comum em microrganismos e plantas, mas que não ocorre em animais e seres humanos. Assim, os aminoácidos triptofano e fenilalanina são considerados essenciais para humanos e para a maioria dos animais, e que necessitam obtê-los pela dieta. A tirosina não é considerada um aminoácido essencial, pois pode ser formada em mamíferos a partir da fenilalanina consumida (RODRIGUEZ *et al.*, 2014; SPRENGER, 2006).

Os aminoácidos aromáticos desempenham papéis na biossíntese de proteínas, na manutenção da massa muscular e são precursores de muitos compostos bioativos como vitaminas, hormônios e neurotransmissores, e por isso, são amplamente usados como

aditivos em alimentos e como suplementos (JONCKHEERE *et al.*, 2017; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2011).

Nas plantas, os aminoácidos aromáticos participam das estruturas celulares e são precursores de metabólitos secundários, que desempenham funções fundamentais no desenvolvimento, adaptação e mecanismos de defesa. Entre os metabólitos secundários das plantas estão os alcaloides, flavonoides, taninos e ligninas, que encontram aplicações como ingredientes nutracêuticos e farmacêuticos (RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

O mercado mundial de aminoácidos é de US\$ 8 bilhões por ano e impacta principalmente as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Entre os aminoácidos aromáticos, o triptofano tem um mercado de consumo estimado em mais de 14 mil toneladas por ano e a de fenilalanina excede 30 mil toneladas por ano (SANCHEZ *et al.*, 2018; RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

Devido ao expressivo consumo e importância industrial, diversos estudos exploram as possibilidades de obtenção de aminoácidos aromáticos utilizando engenharia genética aplicada aos microrganismos *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (HUCCETOGULLARI *et al.*, 2019; RODRIGUEZ *et al.*, 2015; RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

No entanto, há outras metodologias e fontes das quais é possível recuperá-los. Sá *et al.* (2020) discutiram o perfil de aminoácidos em vários vegetais como legumes, cereais, sementes, folhas e raízes. Todas as fontes citadas apresentaram alguma concentração de aminoácidos aromáticos. O estudo também sugeriu o aproveitamento de resíduos agroindustriais para fermentação, por serem fonte barata de carbono e nitrogênio, e citou a possibilidade de obter aminoácidos aromáticos por meio dessa aplicação (SÁ *et al.*, 2020; SANCHEZ *et al.*, 2018).

Em frutas cítricas como limão (*Citrus lemon* L. Burm f.), pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck), toranja (*Citrus paradisi* Macf), laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck) e tangerina (*C. reticulata* Marcf.) foram constatadas a presença de aminoácidos aromáticos em diversas partes dos frutos, no entanto, as maiores concentrações foram obtidas nos flavedos (WANG *et al.*, 2016).

Zhu *et al.* (2020) analisaram os conteúdos de aminoácidos de três variedades da fruta cítrica pomelo e observaram que os aminoácidos essenciais representavam cerca de

36% do conteúdo total, com destaque em abundância, dentre os aromáticos, para a fenilalanina.

A fermentação do suco de laranja com a levedura *Saccharomycetaceae var. Pichia kluyveri* resultou na diminuição de 13 mg/L para 5 mg/L na concentração de triptofano, segundo Cerrillo *et al.* (2015). Os autores sugeriram que a levedura utiliza o triptofano para a produção de compostos para manutenção do crescimento microbiano.

Já em FES, conduzida com borras de chá como substrato e *Aspergillus niger* como inóculo, foi observado aumento na concentração de aminoácidos aromáticos em 10 vezes (de 100 mg/100g para 1000 mg/100g) (CUI *et al.*, 2021).

Assim, a literatura sugere que os resíduos de laranja e a FES são importantes para a obtenção de aminoácidos aromáticos e estes podem ser importantes como constituintes de proteínas/enzimas, bem como precursores de aminas biogênicas, todos estes de grande importância na indústria cosmética, como descritos a seguir.

4.1.1. Enzimas

Enzimas são proteínas altamente especializadas em catalisar reações biológicas, têm alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições adaptáveis de temperatura e pH (NELSON; COX, 2014).

A atual demanda por alternativas sustentáveis e renováveis, tem impulsionado o aumento da carência por enzimas. No final de 2021, o mercado global de enzimas industriais foi avaliado em US\$ 6 bilhões e pode chegar a US\$ 9 bilhões em 2032, com taxa de crescimento anual de 3,9% (FACT.MR, 2022).

As enzimas obtidas por processos biotecnológicos são reconhecidas como alternativa viável para diferentes finalidades. A maior parte das enzimas comerciais utilizadas atualmente são produzidas por microrganismos. Em conjunto com os esforços para valorizar os resíduos sólidos agroindustriais, pode-se obter enzimas vegetais consideradas econômicas, seguras e ecologicamente corretas para somar com as enzimas microbianas já existentes, as quais são populares industrialmente por sua ampla gama de aplicações (FACT.MR, 2022; PANDA *et al.*, 2016).

As atividades enzimáticas estão relacionadas com a estrutura proteica das enzimas, que são classificadas de acordo com a reação mais comum catalisada por elas,

em condições que as diferenciam dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Estes apresentam baixa seletividade pelo substrato, geram resíduos reacionais e descartes que classificam a catálise sintética como não ecologicamente correta (POPPE *et al.*, 2015).

Muitas enzimas, com diferentes atividades catalíticas já foram descritas e descobertas, no entanto, representam uma pequena fração da diversidade de enzimas disponíveis na natureza (MADHAVAN *et al.*, 2017).

Cerca de 75% das enzimas produzidas em escala industrial pertencem ao grupo das hidrolases, que catalisam a quebra de ligações na presença de moléculas de água, como as proteases e lipases. Outro grupo bastante promissor é o das óxido redutases, que catalisam a transferência de elétrons por reações de oxirredução, como a superóxido dismutase (SOD) (FASIM *et al.*, 2021; OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; OKINO-DELGADO *et al.*, 2018).

Na indústria de cosméticos, várias enzimas são aplicadas em formulações para modular reações bioquímicas da pele visando a limpeza, renovação e proteção contra agentes externos (GOMES *et al.*, 2020).

Sendo assim, a seguir serão descritas as principais enzimas aplicadas aos cosméticos e produtos de higiene pessoal.

4.1.2. Proteases

Proteases (EC 3.4) são um grupo de enzimas multifuncionais que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas em outras proteínas menores, peptídeos e aminoácidos e podem realizar reações de síntese entre ligações éster e amida. Essas enzimas diferem quanto a atividade catalítica, especificidade do substrato e do sítio ativo, perfis de estabilidade, temperatura e pH. Este último parâmetro bioquímico pode ser usado para classificá-las em ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,0-8,0) ou alcalinas (pH 8,0-13,0) (NAVEED *et al.*, 2021; OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2015).

São importantes catalisadores biológicos envolvidos em diversos processos bioquímicos e biológicos de todos os seres vivos, representando nos seres humanos cerca de 2% do genoma (NAVEED *et al.*, 2021; OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; BARBERIS *et al.*, 2018).

Devido às diferentes propriedades e características, as proteases são isoladas e direcionadas para diversas aplicações industriais como para a produção de detergentes; tratamento do couro; em alimentos como carnes, queijos e bebidas; para a biorremediação de óleos e outras; e em fármacos e cosméticos (TRONCOSO *et al.*, 2022; NAVEED *et al.*, 2021; BARBERIS *et al.*, 2018).

As proteases têm sido usadas industrialmente desde o início da tecnologia enzimática nas primeiras décadas do século XX, representando na atualidade e comercialmente 60% do mercado de enzimas. Devido aos investimentos e produção em larga escala, as de origem microbiana representam a maior fração disponível no mercado, no entanto, as de origem vegetal são amplamente utilizadas e têm grande relevância industrial (TRONCOSO *et al.*, 2022; BARBERIS *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2015).

De maneira geral, as proteases são empregadas pela indústria cosmética e costumam majoritariamente seguir duas abordagens, a saber: a) como catalisadoras de substratos proteicos para obtenção de compostos bioativos com propriedades funcionais, como por exemplo, peptídeos e hidrolisados antioxidantes; e b) como ingrediente ativo para esfoliar a pele, pois devido à especificidade pelo substrato representa alternativa vantajosa quando comparada às esfoliações físicas ou químicas (TRONCOSO *et al.*, 2022; PACKIANATHAN; KANDASAMY, 2011).

As proteases ao serem adicionadas em cremes e pomadas para tratamentos dérmicos e cicatrizantes apresentam vantagens consideráveis sobre os catalisadores químicos, principalmente por sua ação específica, segura e sustentável. Para promover a esfoliação da pele (descamação da camada córnea superficial queratinizada), as proteases desacoplam moléculas complexas inativas de proteínas e transforma-as em moléculas simples e muitas vezes ativas, permitindo assim maior absorção de água e de outros compostos benéficos para a pele e que estão presentes nas formulações (GONÇALVES, 2021; GOMES *et al.*, 2020; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Recentemente, as proteases vegetais foram reportadas como inibidoras de tirosinase, enzima que sintetiza a melanina, e pode causar estresse oxidativo e manchas na pele (TRONCOSO *et al.*, 2022). As principais enzimas vegetais utilizadas em formulações cosméticas são proteases, a saber: as bromelinas obtidas do abacaxi (*Ananas comosus*), a papaína do mamão (*Carica papaya*) e a ficina do látex da figueira (*Ficus carica*) (GONÇALVES, 2021).

As bromelinas obtidas do caule (EC 3.4.22.32) e do fruto em si (EC 3.4.22.33) são aplicadas na indústria cosmética e de higiene pessoal para o clareamento dental, incluso com a diminuição de aditivos químicos nas formulações; no tratamento de acnes, rugas e pele seca; e, na redução de hematomas e inchaço pós-injeção (TRONCOSO *et al.*, 2022; GONÇALVES, 2021; LOURENÇO *et al.*, 2016).

A papaína (EC 3.4.22.2), encontrada em uma concentração de cerca de 8% em frutos de mamão, são aplicadas principalmente como esfoliantes especiais para peles sensíveis, alérgicas ou danificadas pelo sol. Nesta aplicação hidrolisam em torno de 15% da proteína do tecido conjuntivo, atuam sobre o colágeno tipo I, que é o principal componente estrutural da matriz extracelular, melhorando assim a hidratação e aparência da pele. A enzima ainda é capaz de promover a descamação da pele ao mesmo tempo que promove o efeito calmante, o que permite a penetração de aditivos biológicos e hidratantes. São também aplicadas para diminuição de sardas e manchas marrons devido à exposição à luz solar e na medicina terapêutica é utilizada para o desbridamento de tecidos desvitalizados, o que acelera o processo de cicatrização de feridas e queimaduras (TRONCOSO *et al.*, 2022; GONÇALVES, 2021).

A ficina (EC 3.4.22.3), obtida do látex do caule da figueira, também atua como esfoliante, potencializador da atividade antioxidante ao favorecer a absorção de ativos pela pele, clareador de manchas de pele e de dentes (TRONCOSO *et al.*, 2022; GONÇALVES, 2021).

Em pesquisa recente, a ficina apresentou atividade catalítica de 60% na faixa de pH de 4,5 a 5,0, que corresponde ao pH normal da pele; em solução apresentou atividade antioxidante na eliminação de radicais livres de 72,3% de eliminação de peróxidos e de 78,7% de eliminação de DPPH; atividade anti-inflamatória ao diminuir a expressão de proteínas sinalizadoras como como IκB e NF-κB e MAPKs; bem como efeito clareador de 0,9% testado *in vitro* em células de melanoma de camundongo (CHO *et al.*, 2019).

O mercado cosmético está em contínuo crescimento, portanto, novas fontes para ativos e ingredientes devem ser constantemente exploradas.

Proteases de kiwi (*Actinidia deliciosa*), por exemplo, foram aplicadas em xampu, e hidrolisaram a queratina resultando na remoção da sujeira adsorvida no cabelo, melhorando assim o refinamento das cutículas capilares (TRONCOSO *et al.*, 2022; CHOI *et al.*, 2012).

Sementes de romã e abóbora (resíduos e descartes de frutas) foram relatadas como fontes de proteases para aplicações cosméticas em esfoliantes e sabonetes (TREVISOL *et al.*, 2021; PACKIANATHAN; KANDASAMY, 2011).

Assim, apesar das proteases vegetais ocuparem lugar de destaque nas aplicações cosméticas, as opções ainda são escassas visto a grande variedade de biomoléculas que são passíveis de recuperação de vegetais e de seus resíduos (HEATH *et al.*, 2022).

Além dos vegetais, os microrganismos representam fontes atrativas para novas proteases, pois podem ser cultivados em grande escala por métodos pré-estabelecidos com tempo curto (até 120 h em média) de obtenção (NAVEED *et al.*, 2021; SANGHVI *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2015).

As proteases microbianas podem ser aplicadas em formulações cosméticas e terapêuticas.

O gênero *Bacillus* sp. é descrito como produtor de proteases com potencial aplicação cosmética. As queratinases (EC 3.4.99.11), por exemplo, que podem ser obtidas de *B. licheniformis* e *B. subtilis*, possuem a capacidade de hidrolisar queratina presente na pele e cabelo e aplicação promissora em cremes depilatórios (SANGHVI *et al.*, 2016).

Proteases alcalinas obtidas de *Aspergillus niger* apresentaram atividade de hidrólise do colágeno e, por isso, podem ser classificadas como colagenases (EC 3.4.24.3) e utilizadas em cremes e pomadas para cuidados da pele com potencial renovador e cicatrizante (NAVEED *et al.*, 2021).

Zanutto-Elgui *et al.* (2019) reportaram a produção de proteases por FES em farelo de trigo e soja, com *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus flavipes*. As proteases obtidas foram utilizadas na produção de peptídeos bioativos com atividade antioxidante e antimicrobiana a partir da hidrólise do leite. Queratinases foram produzidas por FES com *A. flavipes* em resíduos de penas de aves (EL-AYOUTY *et al.*, 2012) e resíduos de suco de laranja doce (*C. sinensis*) foram reportados como fontes de proteases antes e após fermentação (CAMARGO *et al.*, 2022).

4.1.3. Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3) ou triacilglicerol acil hidrolases são enzimas que atuam na presença de glicerídeos, ésteres e ácidos graxos em reações de hidrólise na interface óleo-água e em reações de síntese como alcoólise, aminólise, acilação, amidação, esterificação,

transesterificação e interesterificação. Possuem alta especificidade e seletividade em diferentes substratos e condições reacionais e podem ser aplicadas no setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (SUN *et al.*, 2020; OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; DUARTE *et al.*, 2016; GOLAKI *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2013).

As lipases ocupam o terceiro lugar de enzima mais comercializada depois das proteases e carboidratases, e são responsáveis por mais de um quinto do mercado global de enzimas. Podem ser obtidas de fontes animal, vegetal e microbiana. As lipases de origem animal podem ser produzidas por órgãos e células específicas que as sintetizam ou por organismos hospedeiros presentes no trato gastrointestinal de animais. As lipases de origem vegetal são encontradas em sementes, grãos, frutas, folhas, cascas, caules, entre outros. As de origem microbiana são obtidas de fungos, leveduras e bactérias por processos fermentativos, são abundantes e possuem uma grande diversidade de características e especificidades (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; FILHO *et al.*, 2019).

Considerando a economia circular, as lipases vegetais se tornam atrativas devido ao seu baixo custo de produção atrelado às formas de obtenção que pode ser diretamente de resíduos agrícolas ou pela utilização destes em FES (neste caso, as lipases também podem ser liberadas pela atuação microbiana) (CAMARGO *et al.*, 2022; FILHO *et al.*, 2019; PANDA *et al.*, 2016; ATHANÁZIO-HELIODORO *et al.*, 2018).

As lipases microbianas são as mais utilizadas industrialmente e na produção de cosméticos não é diferente. Isso se deve ao baixo custo de fabricação, estabilidade superior e maior disponibilidade comparado a lipases de outras fontes (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; CHANDRA *et al.*, 2020; FILHO *et al.*, 2019).

De maneira geral, devido à diversidade de reações catalisadas, as lipases apresentam diferentes aplicações na produção de ingredientes cosméticos (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Na produção de cosméticos podem ser aplicadas como ingredientes bioativos ou como biocatalisadores na síntese de ativos cosméticos específicos. Como ativos, as lipases atuam no metabolismo das glândulas sebáceas e adipócitos, estimulam os mecanismos naturais de defesa da pele e protegem as fibras de colágeno e elastina. Assim, podem ser aplicadas principalmente em cosméticos para limpeza superficial e manutenção do sebo natural da pele, tratamentos capilares, leve esfoliação e remoção de sujeira ou pequenas frações de pele morta, muitas vezes de forma combinada com outras

enzimas, como as proteases. Óleos de banho e cremes para gordura localizada e redução de medidas também contam com a adição de lipases para ajudar na hidratação e melhorar o aspecto da pele (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; CHANDRA *et al.*, 2020; MEHTA *et al.*, 2017; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

No campo da perfumaria, por exemplo, lipases catalisam a conversão de éster de hidroácidos (inativos) em hidroácidos (ativos) e podem proporcionar um aroma uniforme, gradual e agradável em função do tempo (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

As lipases, embora mais onerosas, também são substitutas em potencial aos catalisadores químicos, com vistas ao oferecimento de um produto, em geral, com mais qualidade devido à especificidade enzimática (CHANDRA *et al.*, 2020).

Como exemplo, ácidos graxos e álcoois, produtos resultantes da hidrólise de glicerídeos por lipases, substituem cada vez mais os óleos comuns (óleo mineral ou vaselina) como fase oleosa em emulsões cosméticas. Além disso, ésteres (produtos da ação de lipases a depender do sistema reacional) são os compostos mais usados em produtos cosméticos depois da água. Podem também ser transformados por lipases para produzir emolientes para cremes, tensoativos para xampus, antioxidantes para cremes antienvelhecimento, fragrâncias para perfumes e aromatizantes para maquiagens (KHAN; RATHOD, 2015; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Os ésteres miristato de isopropila, decil cocoato, acetil ricinoleato, oleil erucate, isoamil cocoato e 2-etilhexilpalmitato, por exemplo, foram produzidos por lipases e são comercializados e utilizados como emolientes para formulações cosméticas (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013). Já o éster monoácido de propilenoglicerol, usado como emulsificante e agente perolizante em cosméticos e alimentos, foi também produzido por lipase e conferiu uma patente à empresa *Nippon Oil and Fats* (CHANDRA *et al.*, 2020; MEHTA *et al.*, 2017).

Além disso, lipases fúngicas têm sido utilizadas na acilação entre ácidos graxos e vitaminas como o retinol (vitamina A), o ácido L-ascórbico (vitamina C) e o alfa-tocoferol (vitamina E). As vitaminas são potentes antioxidantes para cosméticos e enfrentam problemas para serem incluídas em formulações devido às suas reatividades e solubilidades. A utilização de lipases permite a obtenção de ésteres que podem melhorar a estabilidade em diferentes formulações, a solubilidade em substâncias lipídicas e a

absorção pela pele (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; CHANDRA *et al.*, 2020; KHAN; RATHOD, 2015).

Ademais, por transesterificação do 3,7-dimetil-4,7-octadien-1-ol com lipases microbianas foi produzida fragrância essencial de rosas, amplamente utilizada na indústria de perfumes e cosméticos (CHANDRA *et al.*, 2020; MEHTA *et al.*, 2017).

Os resíduos de laranja do processamento de suco, já foram descritos como fontes diretas de lipases (FRANCISCO *et al.*, 2019; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2014), e como substrato para FES para a produção de lipases (CAMARGO *et al.*, 2022; ATHANÁZIO-HELIODORO *et al.*, 2018), indicando a possibilidade da utilização dessas enzimas para cosméticos.

4.1.4. Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) são um grupo de metaloenzimas que pertencem à classe das enzimas oxidoredutases e catalisam reações de oxidação e redução (YOUNUS, 2018; SUNAR *et al.*, 2016).

São chamadas de enzimas antioxidantes, pois atuam no controle dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) ao limitar a toxicidade potencial dessas moléculas e sinalizar as funções de controle para a regulação celular (GOMES *et al.*, 2020).

As EROs são produzidas, transformadas e consumidas em organismos vivos pelas células durante atividades metabólicas normais, como a fosforilação oxidativa mitocondrial. No entanto, o aumento dos níveis dessas moléculas resulta em danos às células pela oxidação dos seus componentes. Dentre os EROs, o radical superóxido (O_2^{\bullet}) é um dos mais reativos e tóxicos ao organismo, sendo a enzima SOD capaz de dismutar o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (KUMAR *et al.*, 2022; DEBATA *et al.*, 2021; YOUNUS, 2018; SUNAR *et al.*, 2016).

As SODs podem ser classificadas de acordo com os seus cofatores em cobre-zinco SOD (CuZn SOD), manganês SOD (Mn SOD), ferro SOD (Fe SOD) e níquel SOD (Ni SOD). As isoformas de SOD são distribuídas em todos os organismos e presentes em diferentes compartimentos celulares. Já a CuZn SOD pode ser encontrada também no espaço extracelular, e por possuir excelente atividade antioxidante é comumente usada para diferentes aplicações, incluindo a cosmética (KUMAR *et al.*, 2022; DEBATA *et al.*, 2021; YOUNUS, 2018).

Em cosméticos, as SOD são aplicadas como ativos antioxidantes com a função de minimizar os danos que podem ser causados pelos EROs em função da exposição da pele à poluição e aos raios UV. Importante enfatizar que a exposição solar já foi relacionada com estresse oxidativo sofrido pela pele e que resulta em perda de elasticidade, fotoenvelhecimento e rugas de expressão (fator este também relacionado à idade) (SINGH, 2017; SUNAR *et al.*, 2016; LODS *et al.*, 2000).

Atualmente a SOD é amplamente utilizada em diversas formulações cosméticas comerciais, como hidratantes, protetores solares, cremes para clarear a pele, cremes para os olhos, esmaltes e sprays anti-queda capilar (GOMES *et al.*, 2020; BAFANA *et al.*, 2011).

Essas óxido redutases também têm potencial em evitar efeitos adversos de fórmulas (BAFANA *et al.*, 2011), ou seja, quando batons e cremes faciais foram associados à produção de EROs e, por consequência, causaram hemólise e peroxidação lipídica em eritrócitos humanos, as enzimas SOD foram adicionadas na formulação para reduzir ou reverter os efeitos indesejados (HANS *et al.*, 2008).

Grandes empresas como LONZA, DSN *Nutritional Products*, *Istituto Ricerche Applicata* (IRA) e MD *Skincare* são especializadas em produzir ingredientes ativos como a SOD para serem incorporadas em diversos produtos, dentre eles os cosméticos (SUNAR *et al.*, 2016).

A multinacional francesa L'Oreal, foi a primeira a adquirir uma patente para uso de SOD de microrganismos de origem marinha em 1973, o que possibilitou a aplicação dela em diversos produtos (HEATH *et al.*, 2022). Estudos posteriores identificaram outras espécies de microrganismos marinhos como o gênero *Photobacterium* sp. que foram considerados promissores produtores de SOD (SUNAR *et al.*, 2016; BAFANA *et al.*, 2011; LODS *et al.*, 2000).

A Dismutin-bt®, por exemplo, é um produto comercial de SOD recombinante produzida a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, considerada ingrediente primário de diversos produtos cosméticos (SUNAR *et al.*, 2016; BAFANA *et al.*, 2011).

As enzimas SOD podem ser obtidas também de fontes vegetais como do limão siciliano (*C. limon*) (UTAMI *et al.*, 2018), de outras espécies de *Citrus* sp. (RAIESI;

GOLMOHAMMADI, 2020), do açafrão-da-terra (*Curcuma longa*) e da ervilha (*Pisum sativum*) (BAFANA *et al.*, 2011).

São também são aplicadas nos nutricosméticos, que são suplementos alimentares com atividade biológica que podem estimular a proteção e produção endógena de SOD e catalase, que são enzimas comuns ao sistema antioxidante protetor do metabolismo humano (YOUNUS, 2018; BARCLAY, 2007). Alguns produtos nessa linha já são comercializados, a saber: o GliSODin®, cápsulas de uso oral compostas da SOD obtida do melão cantaloupe (*Cucumis melo cantalupensis* Naud) e da proteína gliadina, que serve como um estabilizante para a enzima (FONTAS *et al.*, 2021) e, a SODzyme®, também comercializada no formato de cápsulas e que possui em sua composição SODs originadas do milho, soja e trigo (STEPHENIE *et al.*, 2020; BARCLAY, 2007).

4.2. Aminas biogênicas

As aminas biogênicas são fonte de nitrogênio, formadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos ou pela transaminação de aldeídos e cetonas. São moléculas orgânicas de baixo peso molecular, que possuem atividade biológica (HALÁSZ *et al.*, 1994).

As estruturas químicas básicas das aminas biogênicas podem ser organizadas em três grupos: alifáticas, aromáticas e heterocíclicas. Podem ainda ser classificadas de acordo com a quantidade de grupos amino, como monoaminas, diaminas e poliaminas (WÓJCIK *et al.*, 2021; ÖZOGUL; ÖZOGUL, 2020; NAILA *et al.*, 2010).

Estão presentes de forma endógena, no metabolismo de microrganismos, plantas e animais, são precursoras para a síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucleicos, aminoácidos e, por consequência, de proteínas (SPANNO *et al.*, 2010; KAROVICOVA; KOHAJDOVA, 2005).

Como participantes de processos fisiológicos importantes, as aminas biogênicas desempenham atividades como eliminação de radicais livres, suporte para crescimento e proliferação celular, manutenção adequada da pressão sanguínea e temperatura corporal, e, por isso, algumas são consideradas promotoras de saúde e bem-estar. Entre as principais aminas biogênicas podemos citar a dopamina, serotonina, agmatina, espermina e espermidina (BASÍLIO *et al.*, 2022; WÓJCIK *et al.*, 2021; KAROVICOVA; KOHAJDOVA, 2005).

Outras, quando consumidas em excesso podem ser prejudiciais à saúde, provocando intoxicações e alergias. Podem ainda, no caso de alimentos, apontar estados avançados de deterioração, contaminação e má-qualidade de produtos, como a histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (BASÍLIO *et al.*, 2022; DOEUN *et al.*, 2017; NAILA *et al.*, 2010). No entanto, a putrescina e a cadaverina foram descritas como as aminas biogênicas mais comuns em alimentos pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), indicando a necessidade de mais estudos para entender em quais concentrações e situações essas aminas biogênicas são prejudiciais ou não (DEL RIO *et al.*, 2019).

No grupo das monoaminas destaca-se principalmente a serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina. É sintetizada no corpo humano, no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal, a partir do aminoácido essencial L-triptofano (OZCELIK *et al.*, 2020; JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008). O aminoácido precursor L-triptofano é hidroxilado através da enzima triptofano hidroxilase e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). A enzima ocorre em duas isoformas, triptofano hidroxilase-1 e triptofano hidroxilase-2, responsáveis pela síntese não neuronal e neuronal, respectivamente. O 5-HTP é, por sua vez, convertido em serotonina (5-HT) através da enzima L-aminoácido descarboxilase (JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008).

A serotonina apresenta atividade biológica na manutenção da memória, do sono e do bem-estar, no comportamento sexual, e na fome (OZCELIK *et al.*, 2020) e é reconhecida como um antioxidante natural que pode eliminar diferentes tipos de radicais livres (hidroxila, alcoxila e peroxila) (AZOUZI *et al.*, 2017).

Nas plantas, a serotonina também é produzida a partir do aminoácido triptofano, no entanto, utiliza uma via diferente da observada para humanos. O L-triptofano é convertido para triptamina via descarboxilação e, posteriormente, hidroxilação para formar serotonina. Essas reações são catalisadas pela triptofano descarboxilase (TDC) e triptamina-5-hidroxilase (T-5-H), respectivamente (NEGRI *et al.*, 2021; ERLAND *et al.*, 2018). A serotonina está presente em todas as partes das plantas, mas apresenta maiores concentrações em tecidos submetidos a situações de estresse, responsáveis por transporte de metabólitos e órgãos reprodutivos como as flores (ERLAND *et al.*, 2018).

Outra monoamina importante é a dopamina, um neurotransmissor do grupo das catecolaminas que atua na regulação dos neurônios motores, dos hormônios, da função

de memória espacial, motivação, excitação e nos mecanismos de recompensa e prazer (OZCELIK *et al.*, 2020; KLEIN *et al.*, 2019).

A síntese da dopamina acontece a partir do aminoácido precursor tirosina, ou seja, a enzima tirosina hidroxilase converte tirosina em L-dopa, que pode ser convertido em dopamina pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (dopa descarboxilase). A partir da dopamina, as outras catecolaminas como epinefrina e noraepinefrina podem ser sintetizadas. Outra via de síntese da dopamina ocorre na substância negra do cérebro, localizada no mesencéfalo, onde a p-tiramina pode ser convertida em dopamina por meio da atividade do citocromo P450 (KLEIN *et al.*, 2019).

Em plantas, a dopamina aumenta a resistência sobre estresses biológicos como tolerância à seca, diferentes concentrações de sais e deficiência de nutrientes nas plantas. São descritas em diferentes espécies de vegetais, frutas e legumes. Apesar da variabilidade entre as vias biossintéticas da dopamina em diferentes plantas, há duas vias metabólicas principais, a saber: a) via da enzima tirosina descarboxilase que converte tirosina em tiramina, que posteriormente é catalisada pela monofenol hidroxilase, produzindo dopamina; e b) via da tirosina hidroxilase, que converte tirosina em L-dopa, que em seguida é convertido em dopamina pela dopa descarboxilase (LIU *et al.*, 2020).

O aminoácido tirosina, pode ser precursor de outra amina biogênica, a tiramina, como já citado acima. A tiramina atua como neuromodulador, é precursora dos neurotransmissores octopamina e dopamina. Além disso, tem efeitos cardiovasculares e modula o sistema imune celular. Em altas concentrações, a tiramina provoca efeitos tóxicos, induz hipertensão, enxaqueca e pode causar reações alérgicas (ANDERSEN *et al.*, 2019).

Em plantas, a tiramina está intimamente relacionada com metabolismo secundário, é considerada precursora de um grupo de amidas do ácido hidroxicinâmico, que são basicamente, moléculas de ácidos hidroxicinâmicos (ácido fenólico) conjugados com aminas biogênicas (LEONARD *et al.*, 2022).

A histamina, monoamina de grande relevância, é sintetizada pela descarboxilação de seu aminoácido precursor, a histidina, que é catalisada pela histidina descarboxilase (HDC). É produzida, principalmente, em células do sistema imune (mastócitos e basófilos), neurônios e células epiteliais estomacais (COMAS-BASTÉ *et al.*, 2020); HUANG *et al.*, 2018).

A histamina é sintetizada continuamente e armazenada em grânulos intracelulares até que as células recebam o estímulo ativador apropriado (HUANG *et al.*, 2018). Esta amina está envolvida em vários mecanismos imunológicos e fisiológicos, estimulando a secreção de ácido gástrico, inflamação, contração de células musculares lisas, vasodilatação e produção de citocinas, entre outros processos (COMAS-BASTÉ *et al.*, 2020). Altas concentrações de histamina, podem causar rápida diminuição da temperatura corporal e anafilaxia, reação alérgica grave de início rápido, que pode ser fatal (HUANG *et al.*, 2018).

Em plantas, a histamina está presente majoritariamente em sementes, e pode apresentar aumento de concentração considerável em períodos de germinação, como medida de proteção contra predadores (ORDÓNEZ; CALLEJÓN, 2020).

As diaminas putrescina e cadaverina são produtos da descarboxilação dos aminoácidos ornitina/arginina e lisina, respectivamente. Ambas têm cadeias de hidrocarbonetos curtas com um grupo de amina primária em cada extremidade, a putrescina tem quatro átomos de carbono (C4) na cadeia entre as duas aminas, enquanto a cadaverina apresenta cinco átomos de carbono (C5) (IZQUIERDO *et al.*, 2018).

A putrescina e cadaverina são componentes essenciais para a manutenção da atividade celular, regulação dos ácidos nucleicos, síntese de proteínas e estabilidade de membrana celular (ÖZOGUL; ÖZOGUL, 2020). Apesar das funções biológicas importantes que essas aminas biogênicas desempenham no metabolismo humano, a ingestão de alimentos com altas concentrações delas, pode potencializar os efeitos toxicológicos de outras aminas biogênicas, como a histamina por exemplo (DEL RIO *et al.*, 2019).

Em plantas, a putrescina é a diamina mais comum, e é convertida em espermidina (triamina) e espermina (tetramina) na presença das enzimas espermidina e espermina sintase respectivamente (RAJPAL; TOMAR, 2020). Já a cadaverina é sintetizada pela ação da lisina descarboxilase, presente no cloroplasto. No entanto, quando há um déficit de ornitina, a enzima ornitina descarboxilase é capaz de sintetizar cadaverina a partir de lisina (RAJPAL; TOMAR, 2020). Essas aminas biogênicas exercem múltiplas funções no metabolismo das plantas desde a divisão celular e germinação até o atraso na senescência (ORDÓNEZ; CALLEJÓN, 2020).

As poliaminas agmatina, espermidina e espermina, são consideradas biorreguladores de inúmeras funções celulares (crescimento, divisão e diferenciação celular), estão relacionadas com o reparo tecidual, na sinalização intracelular, interagem em grande parte com os fosfolipídios da membrana e podem desempenhar funções nas membranas das enzimas. A concentração de poliaminas intracelular deriva da síntese, catabolismo, captação e eliminação, pois estão presentes em todos os tipos de células, mas os níveis mais altos são encontrados em tecidos de rápida renovação (GALGANO *et al.*, 2012).

A agmatina é uma tetramina assim como a espermina. Sua biossíntese ocorre pela descarboxilação da arginina, pela enzima arginina descarboxilase. É precursora da diamina putrescina pela via das enzimas ornitina descarboxilase, agmatina deiminase, putrescina carbamoiltransferase e carbamato (PILETZ *et al.*, 2013; GALGANO *et al.*, 2012).

Espermidina e espermina, estão presentes nas plantas como reguladoras da síntese de DNA e proteínas, expressão gênica e proliferação, são estabilizadoras de macromoléculas carregadas negativamente, membranas e fatores antioxidantes (HOU *et al.*, 2019).

Em plantas, a agmatina é intermediária na via da arginina, que leva à produção de compostos que funcionam como substâncias osmoprotetoras, incluindo os aminoácidos prolina e glutamina, pode aumentar a biossíntese de proteínas, contribuir para a eliminação de radicais livres em plantas sob estresse, protegendo assim as células vegetais dos danos oxidativos (JALAL; ABULFARAJ, 2022).

As aminas biogênicas tiramina, N-metiltiramina, hordenina e octopamina foram descritas em folhas de limões, mandarina e toranja do gênero *Citrus* como intermediárias das possíveis vias de biossíntese da amina biogênica sinefrina a partir do aminoácido precursor tirosina (WHEATON; STEWART, 1969). Os principais intermediários na conversão de tirosina em sinefrina, amina simpatomimética que promove estimulação da atividade simpática através do aumento de liberação de catecolaminas, em animais parecem ser tiramina e octopamina, enquanto na mandarina foi observado a descarboxilação de tirosina em tiramina, depois a metilação em N-metiltiramina e então a conversão em sinefrina (WHEATON; STEWART, 1969). As mesmas aminas biogênicas foram descritas na laranja azeda (*Citrus aurantium*) (ROMAN *et al.*, 2007).

O suco e os extratos de diferentes partes da bergamota (*Citrus bergamia* Risso et Poit) foram descritos como fontes de triptofano, triptamina e variações de triptamina metilada (N-metilriptamina; N,N-metilriptamina e N,N,N-metilriptamina). A descarboxilação do triptofano pela triptofano descarboxilase produz triptamina e representa o ponto de partida dos processos metabólicos que levam à formação dos metabólitos secundários derivados do triptofano, a ocorrência de triptamina e seus derivados N-metilados nunca haviam sido descritos em uma planta do gênero *Citrus* e podem representar as formas mais simples de alcalóides monoamínicos (SERVILLO *et al.*, 2012).

Em estudos posteriores, a mesma espécie de bergamota apresentou a presença de serotonina e variações de 5-hidroxi-N-metilriptamina (bufotenina e bufotenidina), essas substâncias podem indicar a via biossintética destinada a fornecer às plantas cítricas defesa química contra predadores (SERVILLO *et al.*, 2013). Servillo *et al.* (2013) sugeriram essa hipótese devido às maiores concentrações destes compostos terem sido encontrados nas folhas e sementes da fruta, partes mais frequentemente atacadas por agentes bióticos.

As folhas e os sucos de espécies de *Citrus*, laranja doce (*Citrus sinensis*), laranja amarga (*Citrus aurantium*), bergamota (*Citrus bergamia* Risso & Poit), cidra (*Citrus medica*), limão siciliano (*Citrus limon*), tangerina (*Citrus reticulata*) e pomelo (*Citrus maxima*) foram descritos como fonte de tiramina e suas variações metiladas e glicosiladas (tiramina- β -D-glicosídeo, N-metiltiramina- β -D-glicosídeo e N,N-metiltiramina- β -D-glicosídeo). A glicosilação torna os compostos menos reativos e mais solúveis em água, é uma forma de prevenir danos celulares e armazenar com segurança os compostos tóxicos empregados pelas plantas para fins defensivos (SERVILLO *et al.*, 2017).

A coexistência em plantas cítricas de derivados de tiramina e serotonina sugere a finalidade comum de todos esses metabólitos secundários para a resposta defensiva contra o estresse biótico nesse importante gênero vegetal (SERVILLO *et al.*, 2017; SERVILLO *et al.*, 2013).

Devido à sua expressiva produção e popularidade, o suco de laranja doce (*Citrus sinensis*) comercial já foi explorado quanto ao seu conteúdo de aminas biogênicas em diversos estudos (VISCIANO; SCHIRONE, 2022; VINCI; MADDALONI, 2020;

ORDÓÑEZ *et al.*, 2016; PRETI *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2015; BASHEER *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2007).

As aminas biogênicas comuns a todas as amostras de sucos testadas foram putrescina e espermidina, aminas que em vegetais estão relacionadas com as funções fisiológicas de crescimento e desenvolvimento da fruta (ORDÓÑEZ; CALLEJÓN, 2020). O principal objetivo dos estudos acerca do suco de laranja foi investigar sobre a origem das aminas biogênicas, por vias endógenas ou por contaminação microbiológica, devido à associação desses compostos à saúde (PRETI *et al.*, 2016). No entanto, entre as pesquisas realizadas até o presente momento, não há registros de estudos que avaliem o conteúdo de aminas biogênicas nos resíduos do processamento de suco de laranja, o que seria relevante visto a importância de investigar esses compostos, quanto à sua origem e vias de biossíntese, bem como, sua recuperação e reaproveitamento.

Em alimentos, é comum que a concentração de aminas biogênicas exógenas, ou seja, que são resultado do metabolismo de microrganismos, especificamente de bactérias, possam estar presentes. Por isso, estão intimamente relacionadas com parâmetros de qualidade e frescor de produtos com alto teor de proteínas (carnes e peixe), submetidos a fermentação (queijos, embutidos, vinhos e cervejas) e vegetais, frutas, chocolates, ovos e laticínios (WÓJCIK *et al.*, 2021; DOEUN *et al.*, 2017; SPANO *et al.*, 2010). Isso acontece porque algumas bactérias, por meio do seu sistema enzimático, são capazes de realizar a descarboxilação de aminoácidos precursores de aminas biogênicas (KAROVICOVA; KOHAJDOVA, 2005).

Algumas espécies de bactérias podem ser usadas como culturas *starter*, preparações com microrganismos vivos ou latentes que são adicionados ao processo de desenvolvimento de produtos que se beneficiam das atividades metabólicas desses microrganismos que conferem propriedades organolépticas desejadas ao produto (DOEUN *et al.*, 2017; SPANO *et al.*, 2010). No entanto, a concentração dessas bactérias, as condições de preparo, armazenamento, validade, ou ainda, a contaminação por outras espécies bacterianas, favorece a presença de compostos não desejáveis, como algumas aminas biogênicas (WÓJCIK *et al.*, 2021; NAILA *et al.*, 2010; HALÁSZ *et al.*, 1994).

As bactérias ácido lácticas são amplamente utilizadas como culturas *starter*, Bartkiene *et al.* (2014) avaliaram a qualidade de farinha de linhaça combinada com *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* após

fermentação em estado sólido (FES) e observaram que as concentrações de aminas biogênicas diminuíram após a fermentação quando comparadas com a farinha de linhaça não fermentada.

A farinha de tremço de duas espécies (*Lupinus luteus* L. e *Lupinus angustifolius* L.) foram aplicadas a FES combinadas com as bactérias *Lactobacillus sakei* e *Pediococcus acidilactici*. Ensaio químicos e bioquímicos sugeriram que a FES melhorou o valor nutricional dos substratos, aumentando a biodisponibilidade de proteínas e aminoácidos e reduzindo a concentração de fatores antinutricionais como a histamina, em comparação com o tratamento que utilizou fermentação submersa (FS) (BARTKIENE *et al.*, 2016).

Arroz, cevada e soja são substratos para a FES com o fungo *Aspergillus oryzae* ou outras espécies de *Aspergillus*, utilizado como cultura *starter* para a produção de koji, ingrediente inicial para o preparo do missô (ou miso), tempero tradicional da culinária japonesa feito a partir da fermentação de soja. No entanto, as concentrações de aminas biogênicas indesejáveis (histamina e tiramina) encontradas em amostras de missô, foram atribuídas as contaminações com *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (ALLWOOD *et al.*, 2021; BYUN; MAH, 2012).

Diferente das bactérias, as vias biossintéticas das aminas biogênicas no metabolismo de fungos filamentosos não são bem compreendidas (KUMAR *et al.*, 2015).

Kumar *et al.* (2015) verificaram uma rota alternativa para a catálise de arginina e agmatina em *Aspergillus niger*, com a ausência da enzima arginina descarboxilase, comum em plantas e outros microrganismos, a via tem início com a arginase convertendo arginina em agmatina, que é metabolizada em 4-guanidinobutirato e depois 4-aminobutirato que é direcionado para o ciclo de Krebs.

Devido a estreita relação entre produtos fermentados e o conteúdo de aminas biogênicas, os produtos de FES são pouco investigados quanto a esses compostos. Mais estudos acerca desse assunto são necessários para que se possa compreender o metabolismo dos fungos, quais são as possibilidades de recuperação e utilização das aminas biogênicas advindas desse bioprocessos, bem como a aplicação em cosméticos.

A polpa da madeira-maçã (*Limonia acidissima* L.) fruta da família Rutaceae, distribuída em regiões da Birmânia, Índia, Malásia e Sri Lanka, é utilizada como matéria-

prima para produção do cosmético Thanaka, utilizado para remover pequenas manchas e lesões que aparecem na pele. Suas propriedades bioativas estão associadas a três derivados da amina biogênica: a tiramina e dois ácidos fenólicos [oxiraniil-(3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fenil)-metanol e oxiraniil-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-metanol]] (KIM *et al.*, 2008).

A bioatividade da tiramina é corroborada por uma patente francesa (WO2004002941 bioatiA1) depositada em 2004, que relata composições cosméticas com tiramina e seus sais derivados com ação clareadora da pele, diminuindo a produção de melanina de maneira eficaz e não tóxica.

Outro estudo, avaliou o composto sintético N-nicotinoil tiramina *in vitro* como agente clareador da pele relativamente seguro e eficaz para uso em cosméticos e no tratamento dermatológico de hiperpigmentação (KIM *et al.*, 2015).

O N-nicotinoil dopamina, composto derivado sintético apresentou ação antioxidante contra o radical DPPH, atividade biológica potencial para a prevenção de danos oxidativos na pele. No teste *in vitro* com modelo de epiderme reconstruída, o composto reduziu significativamente o grau de pigmentação cutânea. Posteriormente, N-nicotinoil dopamina foi avaliado nos testes de sensibilidade de pele por estudos clínicos em humanos na concentração 0,1%, sendo que a aplicação não resultou em sinais de sensibilização ou vermelhidão na pele (KIM *et al.*, 2011).

Compostos conjugados da diamina putrescina obtidos e isolados a partir do farelo do milho, N,N-dicoumaroil-putrescina (DCP), N-p-cumaroil-N-feruloilputrescina (CFP) e N,N-diferuloil-putrescina (DFP), apresentaram atividades antioxidantes em ensaios *in vitro* com os radicais DPPH, superóxido e hidroxila, além disso, DCP e DFP apresentaram atividades inibitórias a síntese de melanina em células de melanoma B16. Esses resultados apontam que os compostos são fontes de antioxidantes naturais e agentes de clareamento da pele em cosméticos (SANG *et al.*, 2007).

O pólen da abelha (*Quercus mongolica*) é fonte de derivados de putrescina, espermidina e espermina que apresentaram ação inibitória da enzima tirosinase, fundamental na síntese da melanina, o que retarda a formação de manchas na pele. Os autores sugerem que o pólen pode ser fonte de ativos para cosméticos naturais (KIM *et al.*, 2018).

A espermidina e espermina estão ativamente envolvidas na proteção das células contra o estresse oxidativo, eliminando radicais livres (TUCCI *et al.*, 2013). Lovaas (1991) descreveu espermidina, espermina e putrescina como antioxidantes eficazes contra oxidação de ácidos graxos poliinsaturados.

A serotonina também foi descrita como antioxidante natural e é precursora da melatonina, amina biogênica que exerce funções hormonais, também considerada ativo antioxidante (AZOUZI *et al.*, 2017; GALANO *et al.*, 2011) e pode inclusive exercer proteção contra raios UVB como foi demonstrado por Lee *et al.* (2003). Os autores, em ensaios *in vitro*, verificaram que a melatonina evitou a apoptose dos fibroblastos dérmicos (cultura primária) na presença dos raios UVB.

A maior parte dos estudos encontrados a respeito da investigação e dosagem das aminas biogênicas são voltados para a compreensão dos seus efeitos no metabolismo humano relacionados à alimentação. Algumas aminas biogênicas já são aplicadas como suplementos para equilibrar a alimentação e promover bem-estar. No entanto, essas biomoléculas apresentam outros potenciais como ação clareadora da pele e combate a radicais livres, que podem ser exploradas para o setor de produtos cosméticos.

4.3. Polifenóis

Os polifenóis, de origem natural ou sintética, compõem uma classe heterogênea que possui potencial ação biológica como antioxidante (SADH *et al.*, 2018; GUAADAQUI *et al.*, 2014).

Os polifenóis, também chamados de compostos fenólicos, são sintetizados naturalmente pelo metabolismo secundário de plantas, onde são responsáveis por funções biológicas específicas, como atrair polinizadores ou dispersores de sementes, pela cor e sabor dos vegetais, por inibir plantas concorrentes, proteger contra patógenos e adversidades ambientais, restaurar e amenizar os danos dos radicais livres gerados durante a fotossíntese, bem como atuar como moléculas de sinalização celular (ARAÚJO *et al.*, 2021; SADH *et al.*, 2018; IRANSHAHI *et al.*, 2015).

O monômero básico dos polifenóis é o anel fenólico que consiste em uma molécula de benzeno (anel aromático) ligada a uma molécula de hidroxila (OH) e são identificados como ácidos fenólicos e álcoois fenólicos (ABBAS *et al.*, 2017). O termo polifenóis abrange uma ampla gama de compostos que podem ser classificados em

diversos grupos, sendo que entre os mais estudados estão os ácidos fenólicos e os flavonoides (ABBAS *et al.*, 2017; WILLIAMSON, 2017; ZOU *et al.*, 2016).

Os ácidos fenólicos são divididos entre ácidos hidroxibenzoicos (possuem 6 átomos de carbono e um grupo carboxílico) e ácidos hidroxicinâmicos (possuem 9 átomos de carbono e são organizados em dois esqueletos de carbono com pelo menos uma molécula de hidrogênio que pode ser substituída por um grupo hidroxila). Em geral, são encontrados naturalmente em frutas e vegetais na forma livre ou ligados, por exemplo, a açúcares, com grandes potenciais bioativos (ARAÚJO *et al.*, 2021; ABBAS *et al.*, 2017).

Os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos, que podem ser chamados de fenil benzopirano, ligados por três carbonos a um anel tetrahydrofurano, sendo que o anel pirano pode apresentar diferentes configurações e implica na subclassificação dos flavonoides em: flavonóis, flavanonas, flavonas, antocianinas e isoflavonas. Dentro de cada grupo, esses compostos apresentam um padrão diferente de hidroxilação e metilação em suas cadeias. Os flavonoides podem ser encontrados na sua forma livre ou glicosilada em plantas, fator determinante na sua função e biodisponibilidade (ARAÚJO *et al.*, 2021; ABBAS *et al.*, 2017; IRANSHAHI *et al.*, 2015).

As propriedades bioativas e os efeitos biológicos dos polifenóis são atribuídos principalmente à capacidade antioxidante de sequestrar ou inibir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, transferir elétrons para radicais livres, ativar enzimas antioxidantes, reduzir o estresse oxidativo e a inflamação (ARAÚJO *et al.*, 2021). Eles também são reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, anti mutagênicas, antialérgicas e de sinalização e modulação celular (SADH *et al.*, 2018).

A atividade funcional de compostos naturais depende de suas propriedades químicas e características estruturais e do uso de técnicas analíticas avançadas para a extração, identificação e purificação desses compostos para otimizar sua atividade e maximizar suas aplicações (SILVA *et al.*, 2020).

Devido às características favoráveis para a saúde dos seres humanos, as pesquisas, além de alertar e recomendar o maior consumo de vegetais para obtenção desses compostos, têm sido destinadas a constatar que plantas, hortaliças, frutas e subprodutos agroindustriais podem ser fontes de baixo custo de compostos fenólicos (SADH *et al.*, 2018).

O uso direto de polifenóis como agentes de melhoria da saúde e/ou contra doenças em medicamentos, suplementos ou nutracêuticos têm sido amplos, no entanto, também possuem perspectiva em aplicações comerciais relacionadas a corantes alimentícios; embalagens bioativas; e produção de tintas, fertilizantes, tensoativos e cosméticos (ARAÚJO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

Em cosméticos, os polifenóis são aplicados como antioxidantes, para limitar e reduzir os danos dos radicais livres na pele e evitar deterioração dos constituintes ativos e oleosos presentes nas formulações. São também utilizados como agentes fotoprotetores, pois podem absorver a radiação ultravioleta. Como já dito, essas atividades biológicas reduzem o envelhecimento precoce e os processos inflamatórios que podem ser desencadeados por fatores ambientais como a poluição e a exposição ao sol (CHERUBIM *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2018).

Dentre os ácidos fenólicos, os ácidos cafeico e ferúlico tornaram-se ingredientes antioxidantes muito populares em cosméticos, devido à alta lipofilicidade que garante a permeabilidade para que possam atravessar as barreiras da pele e atingir os radicais livres formados em camadas mais profundas em função de danos causados pela radiação UVA, além de inibir a produção de melanina, e consequentemente, evitar manchas na pele (HEATH *et al.*, 2022).

Os flavonoides são amplamente utilizados na indústria de cosméticos e são descritos como ativos presentes em nutricosméticos de uso oral e em formulações de uso tópico. São diversos produtos já comercializados com atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, proteção-UV e selante capilar (ADAMSKA-SZEWCZYK; ZGÓRKA, 2019; HENRIQUE; LOPES, 2019).

Existem muito estudos acerca da produção desses compostos por vias sintéticas, no entanto, a indústria cosmética enfrenta uma grande demanda por produtos com ativos naturais, o que acentua a procura por novas fontes e metodologias para obtenção desses compostos bioativos (HEATH *et al.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2018) e ressalta a importância desta pesquisa.

Diversas espécies de *Citrus* sp., por exemplo, foram reportadas como fontes de compostos fenólicos (ADDI *et al.*, 2022; SINGH *et al.*, 2020) como os ácidos fenólicos (ZOU *et al.*, 2016) e os flavonoides (hesperidina, naringenina e a diosmina) (ADAMSKA-SZEWCZYK; ZGÓRKA, 2019; HENRIQUE; LOPES, 2019). Além disso,

resíduos da produção de suco de laranja (*C. sinensis*) de quatro variedades também apresentaram compostos fenólicos, principalmente de hesperidina (PEREIRA *et al.*, 2020).

Os endófitos vegetais (microrganismos presentes em tecidos de plantas sadias e capazes de viver e colonizar sem causar sintomas perceptíveis de doenças) são fontes de metabólitos secundários modificados pela ação dos microrganismos (EL-HAWARY *et al.*, 2020). Há milhares de espécies fúngicas endofíticas, incluindo o gênero *Aspergillus* sp., relatadas como fontes de compostos bioativos, com diversas estruturas químicas e atividades biológicas (EL-HAWARY *et al.*, 2020). Esses dados sugerem que espécies de *Aspergillus* sp. poderiam produzir ou biodisponibilizar polifenóis por meio da FES de acordo com o substrato.

Xue *et al.* (2022), por exemplo, usando cascas de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) como substrato para a FES e *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* como inóculos, relataram o aumento da concentração de compostos fenólicos após fermentação e a detecção do ácido ferúlico, o qual não foi encontrado também na casca de laranja sem fermentação. Os autores sugerem que os fungos foram capazes de disponibilizar o ácido ferúlico que havia sido descrito como parte da estrutura da casca da laranja (XUE *et al.*, 2022).

Os polifenóis dos resíduos de laranja e os produtos de FES devem ser caracterizados quanto a presença de ácidos fenólicos e flavonoides para que suas aplicações, inclusive em cosméticos, possam ser exploradas.

5. CONCLUSÃO

A sociedade tem se preocupado cada vez mais com a origem dos produtos consumidos. Diante dessa demanda o mercado de cosméticos tem buscado alternativas biotecnológicas e científicas para trazer inovação e sustentabilidade aos ingredientes e produtos. Com base nos dados reportados, os resíduos de laranja da produção industrial de suco, resíduos isolados ou fermentados por FES, são promissores para a obtenção de biomoléculas e compostos bioativos, como aminoácidos aromáticos, proteínas/enzimas, aminas biogênicas e polifenóis. Ambos os resíduos podem apresentar atividade antioxidante, de renovação celular, de prevenção de manchas, de clareamento e de esfoliação da pele. No entanto, há a necessidade de se alinhar o reaproveitamento dos resíduos da indústria de alimentos ao setor de cosméticos, bem como obter novos

produtos por bioprocesso sustentável com potencial para atuar como ingrediente ativo nos cuidados com a pele, no contexto da economia circular do cuidado e da beleza. Esfoliante enzimático com ação antioxidante, loção com atividade clareadora de manchas cutâneas e sérum anti-idade com proteção contra radicais livres são opções de produtos que podem incorporar as biomoléculas e os compostos ativos descritos.

II – Objetivos

1. Objetivo geral

Avaliar os resíduos de laranja como fontes de ingredientes ativos e como substratos para produção de metabólitos primários e secundários por fungos em fermentação em estado sólido e testar suas atividades biológicas *in vitro*, visando aplicação em cosméticos.

1.1. Objetivos específicos

- Avaliar a produção de metabólitos primários e secundários por fungos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos de laranja como substrato;

- Determinar as concentrações de aminoácidos aromáticos, proteínas solúveis totais, fenóis totais e flavonoides totais dos resíduos de laranja isolados e fermentados;

- Determinar as atividades de proteases, lipases e superóxido dismutase dos resíduos de laranja isolados e fermentados;

- Determinar a concentração e o perfil das aminas biogênicas dos resíduos de laranja isolados e fermentados;

- Avaliar a capacidade antioxidante dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes metodologias;

- Avaliar a viabilidade, adesão e a citotoxicidade de fibroblastos *in vitro* tratados com os resíduos de laranja isolados e fermentados, bem como a expressão gênica que sinaliza a produção de colágeno.

III – Materiais e Métodos

1. Preparo e obtenção das amostras

1.1. Obtenção das amostras a partir dos resíduos de laranja

As laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck) da variedade Pêra foram processadas pela empresa J. B. T. Food Tech (Araraquara, SP) com a geração dos resíduos bagaço, casca e frit. Esses foram embalados, armazenados separadamente em sacos plásticos identificados, congelados e transportados em caixas térmicas até o Laboratório de Bioprocessos (DCQB, IBB, Unesp). Os resíduos de laranja (bagaço, casca e frit) foram processados separadamente em mixer (Philips Walita) para diminuição das partículas. Para a obtenção das amostras sem fermentação os resíduos foram apenas liofilizados por 48h a -60°C . Após a liofilização foram novamente processados em mixer e macerados em gral com pistilo de porcelana (CAMARGO *et al.*, 2022; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2014) para a obtenção das amostras denominadas de bagaço (B), casca (C) e frit (F) (Figura 3).

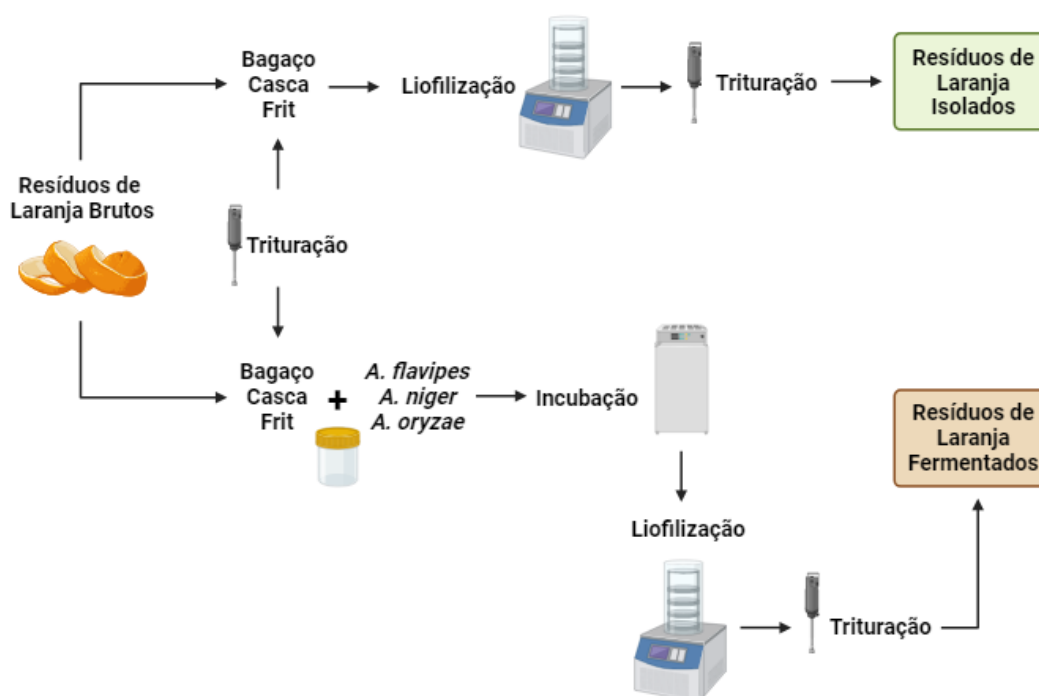


Figura 3. Obtenção das amostras isoladas e fermentadas a partir dos resíduos de laranja.

(Imagem criada em: www.biorender.com)

Para a obtenção das amostras fermentadas, foi utilizada a metodologia descrita por Athanázio-Heliodoro *et al.* (2018). Após o processamento para diminuição das partículas dos resíduos de laranja, 20g de substrato (bagaço, casca ou frit) foi adicionado a potes de coleta universal de 80 ml (reator). Os substratos foram esterilizados em luz UV por 30 min, seguido da adição de 2 ml da suspensão de esporos (10^6 esporos/ml) dos fungos *Aspergillus flavipes* (INCQS 40024), *Aspergillus niger* (CBMAI 2084) ou *Aspergillus oryzae* (INCQS 40068). Para a condução da fermentação os reatores foram mantidos em estufa BOD (*Biochemical Demand for Oxygen*, em português em livre tradução Demanda Bioquímica por Oxigênio) a 30°C por 168h. Após o período de incubação, todo o conteúdo foi liofilizado a -60°C por 48h e processados em *mixer* para a obtenção das amostras fermentadas, as quais foram denominadas e codificadas com siglas, a saber: bagaço fermentado com *A. flavipes* (BF), casca fermentado com *A. flavipes* (CF), frit fermentado com *A. flavipes* (FF), bagaço fermentado com *A. niger* (BN), casca fermentado com *A. niger* (CN), frit fermentado com *A. niger* (FN), bagaço fermentado com *A. oryzae* (BO), casca fermentado com *A. oryzae* (CO) e frit fermentado com *A. oryzae* (FO) (Figura 3). Todas as amostras foram armazenadas refrigeradas a -5°C até a realização dos testes.

1.2. Conservação das linhagens fúngicas

Os fungos são conservados em tubos inclinados contendo Agar Batata Dextrose ou do inglês *Potato Dextrose Agar* (PDA) refrigerados a -5°C, repicados a cada 3 meses. As cepas do *Aspergillus flavipes* (INCQS 40024) e *Aspergillus oryzae* (INCQS 40068) foram obtidas da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). A cepa do *Aspergillus niger* (CBMAI 2084) foi obtida da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

2. Determinação de aminoácidos aromáticos

A análise de aminoácidos aromáticos (livres e/ou em peptídeos e proteínas) foi realizada de acordo com Zaia *et al.* (1998). Em tubos de ensaio de plástico, pesou-se 0,05 g de amostra e adicionou-se 5 ml de água deionizada. Após homogeneização as amostras foram centrifugadas por 20 min a 3.600 rpm. Para reação, adicionou-se em outro tubo de ensaio 1 ml do sobrenadante da amostra e 2 ml de água deionizada. Após 10 min em temperatura ambiente, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 280 nm, utilizando cubetas de quartzo. A concentração de aminoácidos aromáticos foi definida

por equação obtida da curva padrão de triptofano. As concentrações foram expressas em aminoácidos aromáticos (mg/g) de extrato liofilizado.

3. Determinação de proteínas solúveis totais

A concentração de proteínas totais solúveis foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em tubos de ensaio de plásticos pesou-se 0,1g de amostra, adicionou-se 5 ml de tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 6,7) e procedeu-se com centrifugação por 10 min a 3.600 rpm. Para a reação, em tubo de ensaio adicionou-se 0,5 ml do sobrenadante da amostra e 2,5 ml de solução de Bradford. Foram 15 min de reação a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm em cubetas de plástico. A concentração de proteínas solúveis totais foi definida por equação obtida a partir de curva padrão de caseína. As concentrações foram expressas em proteínas solúveis totais (mg/g) de resíduo liofilizado.

4. Atividades enzimáticas

4.1. Determinação da atividade de protease

O ensaio foi realizado de acordo com Charney e Tomarelli (1947) com modificações descritas por Camargo *et al.* (2022). O substrato foi composto por 0,125 g de azocaseína (Sigma-Aldrich), diluída em 25 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7). A reação foi composta por 0,005 g de amostra e 0,5 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7), incubada a 37°C por 40 min. Após a incubação, a reação foi paralisada com a adição de 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) e as amostras centrifugadas a 3.600 rpm por 15 min a 5°C. Posteriormente 1 ml de hidróxido de potássio (KOH) 5 mol/L foi adicionado a 1 ml do sobrenadante e em seguida mensurada a leitura em espectrofotômetro a 428 nm. Os brancos receberam os mesmos reagentes e tampão em substituição a amostra. Os controles de cada amostra receberam tampão invés de azocaseína. A atividade de protease é expressa em (U/g), uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,1 nas condições de ensaio.

4.2. Determinação da atividade de lipase por titulometria

A atividade de lipase foi determinada de acordo com Macedo, Pastore e Park (1997) modificado por Okino-Delgado e Fleuri (2014), em sistema reacional composto por 0,5g de amostra, 3 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 5 ml de emulsão composta por 75% de goma arábica tamponada e 25% de azeite de oliva. A reação foi

conduzida em banho-maria termostaticado a 40°C, 130 opm, por 30 min. Após 30 min, 15 ml de solução paralisadora (etanol P.A. e acetona P.A., 1:1, v/v) e 5 gotas de fenolftaleína foram adicionadas e os ácidos graxos liberados da ação das lipases foram titulados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M. Os brancos receberam os mesmos reagentes e 0,5 ml de tampão fosfato invés da amostra. Os controles de cada amostra receberam a solução paralisadora antes de serem colocados no banho-maria. A atividade de lipase é expressa em (U/g), uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio.

4.3. Determinação das atividades de lipase por espectrofotometria em substratos sintéticos

O p-nitrofenil palmitato (p-NPP, Sigma-Aldrich) é composto por ácidos graxos de cadeia longa e foi utilizado como substrato sintético de 16 carbonos, seguindo a metodologia descrita por Mahadik *et al.* (2002). O meio reacional composto por 0,017g de substrato, 0,1g de goma arábica, 90 ml de água deionizada, 0,4 ml de Triton X-100 e 12 ml isopropanol. No tubo de ensaio para a reação foi adicionado 0,02g de amostra; 0,3 ml tampão fosfato de sódio (0,5 M, pH 7) e 2,7 ml de substrato, a reação foi incubada em banho-maria a 40°C por 15min, após o tempo as amostras foram centrifugadas por 10 min a 5°C e 3.600 rpm. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com absorvância no comprimento de 410 nm. Os brancos receberam os mesmos reagentes e tampão invés da amostra. Os controles de cada amostra receberam tampão invés do substrato. A atividade de lipase para hidrólise de p-NPP é expressa em (U/g), uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,1, nas condições de ensaio.

O p-nitrofenil butirato (p-NPB, Sigma-Aldrich) é composto por ácidos graxos de cadeia curta e foi utilizado como substrato sintético de 4 carbonos, seguindo a metodologia por Lopes *et al.* (2011) e Calado *et al.* (2002). O substrato foi preparado com 0,0115 ml de p-NPB, 10 ml de tampão fosfato de sódio (0,5 M, pH 7,2), 0,2 ml de Triton X-100 e 0,02 ml de tetrahidrofurano (0,43M). A mistura reacional constituída por 0,01g de amostra e 3,43 ml de substrato, foi incubada durante 15 min a 37°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.600 rpm durante 10 min a 5°C. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 405 nm. Os brancos receberam os mesmos reagentes e tampão invés da amostra. Os controles de cada amostra receberam tampão invés do

substrato. A atividade de lipase para hidrólise de p-NPB é expressa em (U/g), uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,1, nas condições de ensaio.

4.4. Determinação da atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi determinada como descrito por Sun *et al.* (1988). A primeira etapa, realizada em tubos de ensaio de plástico cobertos por papel alumínio, consistiu em um processo de extração em que utilizou-se 0,15 g de amostra e 5 ml de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), cuja a mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 seg, seguida de centrifugação por 30 min a 6.000 rpm a 5°C. Após a centrifugação, a segunda etapa procedeu-se em tubos de ensaio de vidro cobertos por papel alumínio com a adição de 100 µl do sobrenadante da amostra, 2 ml de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,8), 250 µl de NBT (cloreto de azul nitrotetrazólio), 200 µl de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 250 µl de metionina e 250 µl riboflavina, seguido de 30 seg no vórtex para homogeneização. Foi preparado um controle correspondente a cada amostra contendo os mesmos reagentes, bem como um branco que não recebeu a amostra, apenas os demais reagentes. As amostras e o branco foram expostos à luz branca por 10 min, sendo que os controles de amostra permaneceram com o papel alumínio sem a exposição. Após a exposição, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 560 nm em cubetas de quartzo. A atividade de SOD é definida como a quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT, a porcentagem de inibição é utilizada para o cálculo da atividade específica de SOD que é expressa em (U/mg) de proteína.

5. Determinação de aminas biogênicas

5.1. Extração de aminas biogênicas

Para a extração de aminas biogênicas foi utilizada a metodologia descrita por Gomez *et al.* (2020). Alíquota de 200 mg das amostras secas foram pesadas em tubos de ensaio, seguida pela adição de 3 ml de ácido perclórico (HClO₄ - 5%), homogeneização e incubação em banho ultrassônico gelado por 30 min. Logo após, procedeu-se com centrifugação a 6.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi separado e mantido em geladeira a -5°C. Em tubo de ensaio de vidro, foi adicionado 200 µL da amostra, 200 µL de tampão carbonato (K₂CO₃) e 400 µL de dansyl, seguido de homogeneização. Logo após as amostras foram mantidas em estufa por 1 h a 60°C. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL de prolina, em seguida as amostras foram mantidas no escuro por 1h e homogeneizadas a cada 15 min. Em seguida foram adicionados 1.000 µL de

tolueno, homogeneizados por 1 min, e depois centrifugadas por 10 min a 6.000 rpm, sendo que o sobrenadante foi retirado e transferido para tubos de ensaio de plástico. Posteriormente, as amostras foram secas em nitrogênio, ressuspendidas em 1 ml de acetonitrila, homogeneizadas por 1 min em banho ultrassônico e centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min. Então as amostras foram filtradas por membranas Whatman® de seringa com poros de 20 µm e transferidas para *vial*.

5.2. Perfil de aminas biogênicas dos resíduos de laranja isolados e fermentados

O perfil de aminas biogênicas foi analisado de acordo com o método descrito por Gomez *et al.* (2020) por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no cromatógrafo (Dionex UltiMate 3000; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), com coluna de fase reversa ACE C18 (4,6 × 250 mm; 5 µm), termostaticada a 25°C, acoplada a bomba com amostrador automático quaternário 3000 e detector de arranjo de diodos (DAD-3000RS). As fases móveis utilizadas foram 50% de acetonitrila (A) e 100% de acetonitrila (B), em um gradiente de 0–2 min, 40% A + 60% B; 2–4 min, 60% A + 40% B; 4–8 min, 65% A + 35% B; 8–12 min, 85% A + 15% B; 12–15 min, 95% A + 5% B; 15–21 min, 85% A + 15% B; 21–22 min, 75% A + 25% B; 22–25 min, 40% A + 60% B. A identificação de aminas e aminoácidos biogênicos baseou-se nos tempos de retenção dos padrões a 225 nm. Foram analisadas as aminas serotonina, dopamina, agmatina, triptamina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, histamina e tiramina e os aminoácidos 5-hidroxitriptofano, L-dopa e triptofano. Os resultados foram expressos em µg/ml.

As concentrações totais das aminas biogênicas (Tabelas 2, 3 e 4) foram utilizadas para os cálculos de indicadores de qualidade das amostras quanto a presença de aminas biogênicas. O cálculo do índice de qualidade química (CQI) seguiu a equação (MIETZ; KARMAS, 1977):

$$CQI = \frac{\textit{histamina} + \textit{putrescina} + \textit{cadaverina}}{1 + \textit{espermidina} + \textit{espermina}}$$

O índice de amina biogênica (BAI), foi calculado usando a seguinte fórmula (VECIANA-NOGUÉS *et al.*, 1997):

$$BAI = \textit{histamina} + \textit{putrescina} + \textit{cadaverina} + \textit{tiramina}$$

O índice de amina (AI) para a análise de aminas biogênicas em amostras de plantas usando a seguinte fórmula (BASÍLIO *et al.*, 2022):

$$AI = \frac{(histamina + putrescina + cadaverina + tiramina)}{(dopamina + serotonina + melatonina + espermidina + espermina)}$$

6. Extração e determinação de compostos fenólicos

Para a extração dos compostos fenólicos foi utilizada a metodologia descrita por Santos e Blatt (1998). A solução extratora foi preparada com 800 ml de metanol, 10 ml de ácido acético e 190 ml de água deionizada. Para extração adicionou-se 8 ml de solução extratora à 0,1g de amostra, a qual foi submetida a 30 seg no vórtex, 30 min no banho de ultrassom e 10 min na centrífuga a 6.000 rpm a 5°C. O sobrenadante foi separado e congelado e utilizado nas análises posteriores.

6.1. Determinação de fenóis totais

A quantificação de fenóis totais foi realizada de acordo com a metodologia de Singleton *et al.* (1999). Para a reação, a um tubo de ensaio adicionou-se 0,5 ml do extrato das amostras, 0,5 ml de água deionizada, 0,5 ml de Folin-Cioulcauteu e 2,5 ml de carbonato de sódio (Na₂O₃). Os tubos foram agitados em vórtex por 30 seg e mantidos no escuro por 60 min em temperatura ambiente. Após o período, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 725 nm, utilizando cubetas de vidro. O branco recebeu os mesmos reagentes, mas invés da amostra, recebeu a mesma medida de solução extratora. O teor de fenóis totais foi definido por equação obtida da curva padrão de ácido gálico (AG). Os resultados foram expressos em ácido gálico equivalente (AGE/100g) de extrato liofilizado.

6.2. Determinação de flavonoides totais

A análise foi conduzida conforme metodologia descrita por Pekal e Pyrzyńska (2014). À tubos de ensaio, adicionou-se 2 ml da amostra, 2 ml de metanol 80% acidificado (solução extratora) e 1 ml de cloreto de alumínio (AlCl₃), as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 seg e em seguida mantidas no escuro por 30 min em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 20 min a 5°C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando cubetas de vidro. O branco recebeu os mesmos reagentes, mas invés da amostra, recebeu a mesma medida de solução extratora. O teor de flavonoides totais foi definido por equação obtida da curva padrão de quercetina (Q). Os resultados foram expressos em quercetina equivalente (QE/100g) de extrato liofilizado.

7. Determinação das atividades antioxidantes

7.1. ABTS – [2,2' Azino-bis (3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico)]

O ensaio foi conduzido de acordo com o método de Re *et al.* (1999), no qual foram utilizados os extratos obtidos no item 5 dos resíduos de laranja sem e com fermentação. A solução estoque do radical ABTS foi preparada com 192 mg de ABTS em 50 ml de água deionizada. A seguir adicionou-se 5 ml da solução estoque de ABTS e 88 µl da solução de persulfato de potássio (140 Mm). A mistura foi homogeneizada e transferida para frasco de vidro âmbar, mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 h. Após esse período, diluiu-se 0,5 ml desta solução em 50 ml de álcool etílico P.A., para utilização na reação. Em tubos de ensaio adicionou-se 30 µl de amostra e 3 ml da solução de ABTS, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 seg e mantidas no escuro por 7 min. As leituras foram realizadas em cubetas de vidro, em espectrofotômetro na absorvância de 734 nm. O branco recebeu os mesmos reagentes, mas invés da amostra, recebeu a mesma medida de solução extratora. A atividade antioxidante para o radical ABTS é calculada por equação obtida da curva padrão de trolox (T). Os resultados são expressos em trolox equivalente (µmol TE/g) de extrato liofilizado.

7.2. DPPH – (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A análise foi realizada utilizando o radical DPPH, com os extratos obtidos no item 5, como descrito por Rossetto *et al.* (2009) e Brand-Williams *et al.* (1995). O preparo da solução de DPPH consistiu em 0,01g do radical diluído em 50 ml de etanol P.A. Para a reação foram adicionados 0,5 ml de amostra, 0,3 ml da solução de DPPH e 3 ml de etanol. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 seg e mantidas no escuro por 60 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm, utilizando cubetas de vidro. O branco recebeu os mesmos reagentes, mas invés da amostra, recebeu a mesma medida de solução extratora. A atividade antioxidante para o radical DPPH é calculada por equação obtida da curva padrão de trolox (T). Os resultados foram expressos em trolox equivalente (µmol TE/g) de extrato liofilizado e em porcentagem de redução do radical DPPH.

7.3. FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power

Os extratos obtidos no item 5, também foram testados de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996), onde a solução de FRAP, composta por 25 ml de tampão acetato (0,3 M, pH 3,6) 2,5 ml de TPTZ (2,4,6-tris tripiridil-S-triazina) 10 mM em 40 mM HCl e 2,5 ml de cloreto de ferro (FeCl₃) foi levada para banho-maria e mantida a

37°C até ficar transparente. Após esse processo, o preparo da mistura reacional ocorreu com 30 µl da amostra, 900 µl do reagente FRAP e 90 µl de água deionizada. As amostras foram mantidas por 60 min a temperatura ambiente. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 594 nm de absorvância, utilizando cubetas de plástico. O branco recebeu os mesmos reagentes, mas invés da amostra, recebeu a mesma medida de solução extratora. A atividade antioxidante para FRAP é calculada por equação obtida da curva padrão de sulfato de ferro (II) (FeSO₄). Os resultados são expressos em (µmol Fe reduzido/kg) de extrato liofilizado.

7.4. MDA – Malonaldeído

A atividade antioxidante dos lipoperóxidos foi conduzida de acordo com metodologia de Heath e Packer (1968). A solução de MDA foi preparada por 0,25g TBA (ácido tiobarbitúrico - C₄H₄N₂O₂S), 10g TCA (ácido tricloroacético - C₂HCl₃O₂) e 100 ml de água deionizada. Para a reação, em tubos de ensaio de plástico, pesou-se 0,1g de amostra e adicionou-se 5 ml da solução de MDA. Então os tubos foram cobertos com papel alumínio e levados para banho-maria a 90°C por 60 min. Após esse período, as amostras foram submetidas ao banho de gelo e levadas para centrifugação durante 20 min a 3.600 rpm. As amostras foram lidas em espectrofotômetro no intervalo de absorvâncias de 560 e 600 nm, utilizando cubetas de vidro. O branco recebeu os mesmos reagentes, exceto as amostras. A atividade antioxidante de MDA é obtida da absorvância não específica a 600 nm subtraída da absorvância de 560 nm. O coeficiente de absorção de MDA (155 mM/cm⁻¹) foi utilizado no cálculo. Os resultados são expressos em MDA (nmol/g) de extrato liofilizado.

8. Viabilidade e Adesão Celular - Citotoxicidade

A viabilidade e adesão de fibroblastos humanos FP96 foram avaliadas conforme a norma técnica ISO 10993-12, 2016. Os fibroblastos humanos FP96 foram semeados na concentração de 5×10^4 células por ml em placas de 96 poços onde foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (antibióticos) e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Após 24h, as células foram tratadas com diferentes concentrações das amostras obtidas por diluições seriadas (6,25 – 50 mg/ml) por mais 24h e após esse período foi adicionado o sal de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]) (1 mg/ml). Após 3h, o

meio contendo MTT foi retirado para a eluição e adicionou-se etanol 100%. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas a 570 nm. Para a abordagem de adesão, as células FP96 foram semeadas em nova placa de 96 poços, repetindo o mesmo protocolo descrito acima e após 24h tratadas adequadamente com as diferentes concentrações das amostras. Depois de 24h de tratamento, a adesão celular foi estimada pela incorporação do corante cristal violeta, eluída em etanol-ácido acético (30-10%) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular (IC50).

9. Determinação da expressão gênica em fibroblastos (FP96)

A expressão gênica foi analisada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) utilizando o sistema de PCR em tempo real QuantStudio®3, utilizando metodologia descrita por Feltran (2019). As células FP96 foram cultivadas seguindo o protocolo descrito no item 8, após 24h foram adicionadas as amostras na concentração de 12,5 mg/ml. Após mais 24h as células foram congeladas até a realização do teste. As mudanças foram avaliadas na transcrição do gene COL1A1 de acordo com a exposição às amostras dos diferentes tratamentos. O mRNA total foi colhido das células usando Ambion Trizol Reagent (Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA) e, posteriormente, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA). O método CT comparativo ($\Delta\Delta C_t$) avaliou a expressão de três genes normalizados de referência indicando a significância das variações.

10. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados da determinação das atividades enzimáticas de lipase e SOD, dos polifenóis e das atividades antioxidantes foram analisados no programa AgroEstat Online. Os experimentos foram delineados em arranjo fatorial duplo (4x3, quatro condições sem fermentação, fermentação por *A. flavipes*, *A. niger* ou *A. oryzae* e três frações de resíduos, bagaço, casca e frit), os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro–Wilk, ao teste de homocedasticidade de Levene, à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados da determinação de aminoácidos aromáticos, de proteínas totais, de atividade de protease, das aminas biogênicas foram analisados pelo RStudio

Cloud, submetidos ao teste de normalidade Shapiro–Wilk, ao teste de homogeneidade de Bartlett, à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

IV – Resultados e Discussões

Algumas biomoléculas e compostos bioativos foram agrupados em itens a fim de se interpretar e correlacionar os resultados de forma facilitada. A interpretação e correlação também foi estendida para outros itens dispostos separadamente neste documento, que não foram agrupados em função da grande quantidade de dados. As comparações dos dados obtidos na presente pesquisa foram relacionadas e discutidas, para a maioria dos casos, com dados da literatura que utilizaram a mesma metodologia e forma de medição das biomoléculas e compostos bioativos. Quando isso não foi possível, equivalências foram calculadas, bem como explicitado no decorrer do texto.

1. Aminoácidos aromáticos, proteínas solúveis totais e atividade de protease

Todos os resíduos de laranja (bagaço, casca e frit) isolados ou fermentados apresentaram aminoácidos aromáticos livres, em peptídeos e/ou em proteínas. O bagaço fermentado com *A. oryzae* apresentou a maior concentração (7,75 mg/g) em relação aos outros tratamentos com o mesmo resíduo. As concentrações de aminoácidos aromáticos na casca isolada e na casca fermentada com *A. flavipes* foram estatisticamente iguais (7,02 e 6,87 mg/g, respectivamente) e maiores em relação aos demais tratamentos com o mesmo resíduo. O frit isolado e o frit fermentado com todas as espécies de *Aspergillus* sp. apresentaram as maiores concentrações de aminoácidos aromáticos em relação aos outros resíduos, sendo que o frit fermentado com *A. niger* apresentou a maior concentração (11,96 mg/g) dentre todos os tratamentos (Tabela 1).

Wang *et al.* (2016) analisaram diferentes espécies de *Citrus* sp., incluindo a laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck), e reportaram as maiores concentrações de aminoácidos livres totais no suco das frutas, maior concentração de aminoácidos aromáticos no flavedo e de leucina e ácido aspártico no albedo. No presente estudo também foi encontrada maior concentração de aminoácidos aromáticos no frit isolado, o qual corresponde à parte mais externa da fruta denominada epicarpo/flavedo. Aminoácidos livres são precursores de vias biossintéticas de flavonoides (ADDI *et al.*, 2022; RODRIGUEZ *et al.*, 2015) e estes desempenham uma barreira fisiológica contra agentes externos em plantas e são encontrados nas porções mais externas da fruta (ADDI *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2016), indicando em parte a grande presença no frit de laranja isolado.

Tabela 1. Concentração de aminoácidos aromáticos, proteínas solúveis totais e atividade de protease nos resíduos de laranja isolados e fermentados.

Amostras	Aminoácidos Aromáticos (mg/g)	Proteínas Solúveis Totais (mg/g)	Atividade de Protease (U/g)
B	5,36 ± 0,16 ^h	42,51 ± 1,1 ^{cde}	3.971,7 ± 70,7 ^{de}
C	7,02 ± 0,08 ^e	24,30 ± 2,7 ^{ef}	3.598,3 ± 84,8 ^e
F	9,47 ± 0,07 ^c	73,73 ± 4,5 ^{bc}	3.618,3 ± 55,1 ^e
BF	7,25 ± 0,05 ^e	141,04 ± 4,3 ^a	5.485,0 ± 127,3 ^{bc}
CF	6,87 ± 0,08 ^e	37,14 ± 2,6 ^{de}	4.371,7 ± 49,5 ^{cde}
FF	10,90 ± 0,12 ^b	109,92 ± 2,8 ^{ab}	4.168,3 ± 155,6 ^{de}
BN	6,47 ± 0,05 ^f	94,55 ± 8,8 ^{ab}	5.785,0 ± 247,5 ^b
CN	6,36 ± 0,07 ^{fg}	19,16 ± 0,1 ^{ef}	5.115,0 ± 81,9 ^{bcd}
FN	11,96 ± 0,04 ^a	35,49 ± 3,4 ^{de}	4.958,3 ± 169,7 ^{cd}
BO	7,75 ± 0,06 ^d	11,47 ± 0,8 ^f	5.198,3 ± 141,4 ^{bcd}
CO	5,99 ± 0,10 ^{gh}	60,09 ± 4,7 ^{bcd}	8.771,7 ± 162,6 ^a
FO	10,75 ± 0,36 ^b	135,13 ± 0,8 ^a	5.751,7 ± 15,3 ^b

B – bagaço de laranja isolado, *C* – casca de laranja isolada, *F* – frit de laranja isolado, *BF* – bagaço fermentado com *A. flavipes*, *CF* – casca fermentada com *A. flavipes*, *FF* – frit fermentado com *A. flavipes*, *BN* – bagaço fermentado com *A. niger*, *CN* – casca fermentada com *A. niger*, *FN* – frit fermentado com *A. niger*, *BO* – bagaço fermentado com *A. oryzae*, *CO* – casca fermentada com *A. oryzae*, *FO* – frit fermentado com *A. oryzae*. ± Desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística na coluna no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Após a FES a concentração de aminoácidos aromáticos (livres, em peptídeos e/ou proteínas) para a maioria dos resíduos aumentou, sendo que no bagaço o incremento nas concentrações foram de 20 a 44% e no frit de 13 a 26% (Tabela 1). Aumento em 10 vezes (de 100 mg/100g para 1000 mg/100g) da concentração de aminoácidos aromáticos também foi observado por Cui *et al.* (2021) ao realizar a FES com borras de chá como substrato e *A. niger* como inóculo em relação ao substrato isolado. Esse aumento pode ser explicado pela síntese de aminoácidos aromáticos que algumas espécies de *Aspergillus* sp. apresentam (CHOERA *et al.*, 2018), bem como pelo aumento da concentração de peptídeos e proteínas após a FES.

Resultado oposto foi encontrado com a casca fermentada com *A. niger* e com *A. oryzae* – nesses casos foi observada a diminuição da concentração de aminoácidos aromáticos após a FES. A casca isolada e a casca fermentada com *A. flavipes* não foram estatisticamente diferentes (Tabela 1). Na fermentação do arroz cozido com *A. oryzae*

para a produção de ácido kójico (ativo usado em cosméticos), por exemplo, Lee et al. (2016) observaram o decréscimo da concentração de aminoácidos aromáticos após a fermentação.

Situação similar foi relatada por Cerrillo *et al.* (2015) que observou a diminuição da concentração de triptofano após a fermentação do suco de laranja com *Saccharomyces cerevisiae*. Essa situação, segundo Cerrillo *et al.* (2015), pode ocorrer porque os microrganismos podem utilizar os aminoácidos livres para atividades metabólicas, uma vez que, como observado por Lee et al. (2016), os aminoácidos são fontes de nitrogênio para microrganismos. Ademais, é importante ressaltar que a composição e o conteúdo de produtos fermentados podem variar (LEE *et al.*, 2016), sendo que o metabolismo microbiano de diferentes espécies fúngicas é peculiar e permite respostas diferentes com concentrações diferentes de biomoléculas e compostos bioativos.

Todas as amostras dos resíduos de laranja isolados e fermentados apresentaram concentrações de proteínas solúveis totais. As maiores concentrações foram observadas no bagaço fermentado com *A. flavipes* (141,04 mg/g) e no frit fermentado com *A. oryzae* (135,13 mg/g) (Tabela 1). Dentre os resíduos isolados, o frit apresentou a maior concentração de proteínas solúveis totais (73,73 mg/g), seguido pelo bagaço (42,51 mg/g) e pela casca (24,30 mg/g) (Tabela 1), valores estes superiores aos descritos para o extrato das flores da laranja azeda (*C. aurantium*) (20 a 35 mg/ml) (MAZORRA-MANZANO *et al.*, 2013), para a casca do limão (*Citrus limetta*) (1,73 mg/ml) (FARHA *et al.*, 2011), para as cascas de romã (0,1221 mg/mL) (KUPNIK *et al.*, 2021) e para cultivares de arroz (14,20 a 11,64 mg/g) (CHOI *et al.*, 2012). Com exceção do bagaço fermentado com *A. oryzae* e do frit fermentado com *A. niger*, todos os outros resíduos de laranja fermentados apresentaram maior concentração de proteínas solúveis totais em relação aos resíduos isolados.

No estudo realizado por Yafetto (2018) após a FES da polpa de mandioca com *Aspergillus niger*, observou-se aumento na concentração de proteínas de 3,85 a 21,54%. Adu *et al.* (2018) utilizaram o mesmo microrganismo e resíduos de abacaxi, batata doce e melancia em FES, e constatou, respectivamente, aumento na concentração de proteínas totais de 42,60; 171,10 e 51,51%, resultados estes semelhantes aos obtidos no presente estudo, pois foi observado incremento na concentração de proteínas totais nos resíduos de laranja após FES de 49 a 197%.

O aumento da concentração de proteínas se dá pela capacidade que as espécies de *Aspergillus* sp. possuem de secretar enzimas metabólicas necessárias para o seu desenvolvimento (ADU *et al.*, 2018). Além disso, a utilização de substrato que possui em sua composição proteínas, como é o caso dos resíduos de laranja, favorece a produção de proteínas exógenas, incremento dessas biomoléculas (YAFETTO, 2018), bem como liberação de proteínas vegetais pela atuação do microrganismo. Já os resíduos do tremoço triturado (*Lupinus angustifolius* L.) utilizados em FES combinados com *Aspergillus sojae* e *Aspergillus ficuum* por Olukomaiyaa *et al.* (2020) após fermentação não demonstraram diferença no percentual de proteínas totais entre os resíduos isolado e fermentado.

Omwango *et al.* (2013) relataram o aumento da concentração de proteínas totais após FES com resíduos de abacaxi e *A. niger* com até 3 dias de incubação, no entanto, após esse período houve declínio na concentração de proteínas totais. Isso foi observado por Adu *et al.* (2018), ou seja, nos produtos de FES de resíduos de abacaxi e batata doce com *A. niger* após 14 dias de fermentação foi constatada a diminuição da concentração de proteínas totais.

No presente estudo situação similar foi observada no bagaço fermentado com *A. oryzae*, e na casca e no frit fermentados com *A. niger*, os quais apresentaram diminuição de 26,9; 52,7 e 48%; respectivamente, na concentração de proteínas totais em relação aos resíduos isolados. Segundo Adu *et al.* (2018), a redução das concentrações de proteínas totais ocorre provavelmente devido à ocorrência de proteólise após alguns dias de fermentação e ao esgotamento das fontes de nutrientes.

Os aminoácidos e proteínas hidrolisadas são utilizados em cosméticos com o principal objetivo de hidratar a pele devido a capacidade de criar ligações com moléculas de água (SALVAGE, 2022) e são utilizados na composição de polímeros que servem como suportes de outros compostos ativos, muitas vezes sintéticos (WINNIK, 1999). Além disso, os aminoácidos, devido suas características anfóteras, são utilizados como estabilizadores e neutralizadores de pH em formulações cosméticas (OSHIMURA; SAKAMOTO, 2017). Ainda, no grupo das proteínas temos as enzimas com aplicações cosméticas, cujos resultados de atividades de protease, lipase e SOD, estão discutidos na sequência.

Todos os resíduos isolados e fermentados apresentaram atividade de protease. O bagaço, casca e frit isolados não apresentaram diferença estatística entre eles. Todos os

resíduos fermentados apresentaram maiores atividades de protease em comparação aos isolados. Os produtos de FES utilizando o bagaço como substrato não apresentaram diferença estatística entre si e apresentaram aumento de atividade de protease de 30 a 45% em relação ao bagaço isolado. A maior atividade de protease foi observada na casca fermentada com *A. oryzae* (8.771,7 U/g), aumento de 143% em relação à casca isolada (Tabela 1).

Lee *et al.* (2016) avaliaram as atividades de proteases de Koji (matéria prima para o preparo de alimentos asiáticos) produzidos a partir da fermentação do arroz com o fungo *A. oryzae* (KCCM 11300P) e com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (KCCM 11718P). Os melhores resultados obtidos pelos autores foram de 31 U/g de protease utilizando *A. oryzae*. No presente estudo, os resíduos de laranja fermentados com *A. oryzae* apresentaram atividades de protease cerca de 290 vezes maiores do que as observadas por Lee *et al.* (2016). O aumento das atividades de proteases nos produtos de FES podem ser explicados pela habilidade que os fungos filamentosos das espécies do gênero *Aspergillus* sp. em secretar enzimas, dentre elas as proteases (KUMITCH *et al.*, 2020). A produção dessas enzimas é influenciada pelo aporte de nutrientes que o substrato apresenta, fator que pode explicar a diferença de atividade de protease em diferentes resíduos.

Todos os resíduos de laranja isolados e fermentados apresentaram atividades de proteases superiores da detectada por Veerabhadrapa *et al.* (2014) que obtiveram 1.553,23 U/g de atividade da enzima após FES conduzida com bagaço de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) e *Aspergillus versicolor*. Todos os resíduos de laranja isolados apresentaram atividade de protease similar à descrita por Savino *et al.* (2021) que realizou FES com farelo de trigo e *Cryphonectria parasitica* e obteve 3.955,6 U/g de atividade da enzima; superiores às encontradas em FES por Ooi *et al.* (2021) (3,5 U/ml de atividade de protease) e por Ortiz *et al.* (2016) (275 U/g de atividade de protease), bem como superior às atividades encontradas em resíduos isolados descrito por Camargo *et al.* (2022) (55 a 40 U/g de atividade de protease detectada em resíduos de uva da produção do vinho e no suco).

As proteases vegetais, do ponto de vista cosmético, podem ser aplicadas para a obtenção de produtos antioxidantes da pele; utilizadas como esfoliantes dérmicos (TRONCOSO *et al.*, 2022; PACKIANATHAN; KANDASAMY, 2011), para tratamentos da pele, cicatrizantes (GONÇALVES, 2021; GOMES *et al.*, 2020; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013); redução de manchas (TRONCOSO *et al.*,

2022), acnes, rugas, pele seca, hematomas, inchaço pós-injeção (TRONCOSO *et al.*, 2022; GONÇALVES, 2021; LOURENÇO *et al.*, 2016), sardas (TRONCOSO *et al.*, 2022; GONÇALVES, 2021), bem como no tratamento capilar e em cremes depilatórios (SANGHVI *et al.*, 2016).

2. Atividades de lipase

Todos os resíduos isolados e fermentados apresentaram atividade de lipase utilizando emulsão de azeite de oliva e goma arábica como substrato. As maiores atividades, sem diferenças estatísticas, foram observadas no bagaço e casca isolados (19,25 U/g e 21,51 U/g, respectivamente), bem como no frit fermentado com *A. niger* (24,06 U/g) (Figura 4).

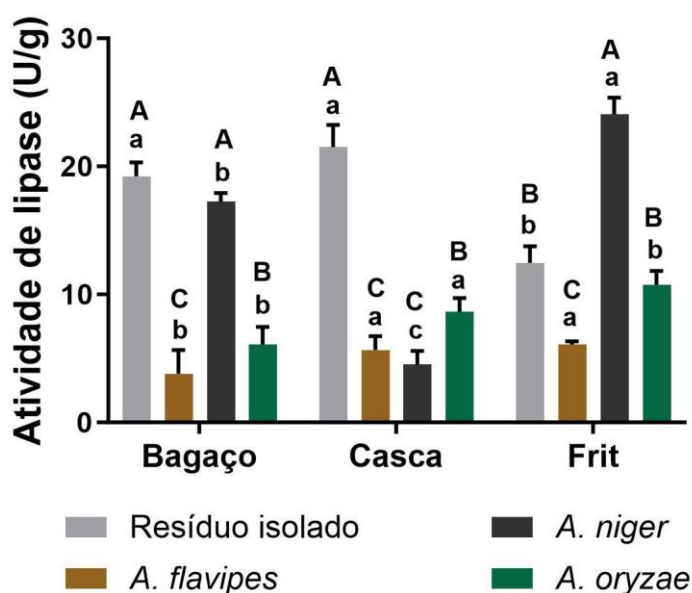


Figura 4. Atividade de lipase dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de *Aspergillus* sp.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resíduos de laranja foram descritos pela primeira vez como fonte de lipases por Okino-Delgado e Fleuri (2014) que observaram a maior atividade de lipase (57,55 U/g) na casca. O frit de laranja isolado também já foi descrito como fonte de lipases (OKINO-DELGADO *et al.*, 2019; OKINO-DELGADO; FLEURI, 2014), no entanto, a FES utilizando frit de laranja com *A. niger* conduzida na presente pesquisa, praticamente dobrou a atividade da enzima em relação ao frit isolado, passando de 12,46 U/g e para

24,06 U/g. Essa situação é similar à obtida por Athanázio-Heliodoro *et al.* (2018) que observaram aumento da atividade de lipase no frit de laranja da variedade Hamlin (52,22 U/g) após FES com *A. niger* (78,77 U/g).

As atividades de lipase encontradas no presente estudo foram inferiores às relatadas por Machado *et al.* (2021) que detectaram 160 U/g de atividade de lipase em sementes não germinadas de mamona, bem como inferiores ou similares, a depender do caso, das encontradas no extrato das sementes do pinhão manso (*Jatropha curcas*) e da planta ornamental castiçal de Natal (*Leonotis nepetifolia*), respectivamente, 90 U/g e 21,31 U/g (VÁZQUEZ *et al.*, 2023).

Em relação às atividades de lipase utilizando substrato sintético de ácidos graxos de cadeia longa p-NPP, a casca (6,53 U/g), o frit fermentado com *A. flavipes* (8,91 U/g) e o frit fermentado com *A. oryzae* (9,48 U/g) apresentaram as maiores atividades de lipase, estatisticamente iguais. O bagaço apresentou atividade utilizando p-NPP (2,30 U/g), no entanto, quando fermentado não apresentou atividade da enzima em questão. O mesmo aconteceu quando a casca foi fermentada com *A. niger* (Figura 5).

Nascimento *et al.* (2021) extraiu e concentrou lipase de semente de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtendo 492 U/ml de atividade da enzima. A Palatase® (lipase comercial recombinante de *Rhizopus miehei* e *Aspergillus oryzae*) (MAHFOUDHI *et al.*, 2022) testada por Lorenzetti (2007) como ativo para formulação cosmética, possui 405,2 U/ml de atividade. Ambos os estudos apresentaram atividade superior às encontradas na presente pesquisa, no entanto, os estudos da literatura realizaram concentração e/ou purificação enzimática, o que pode justificar, em parte, a atividade superior.

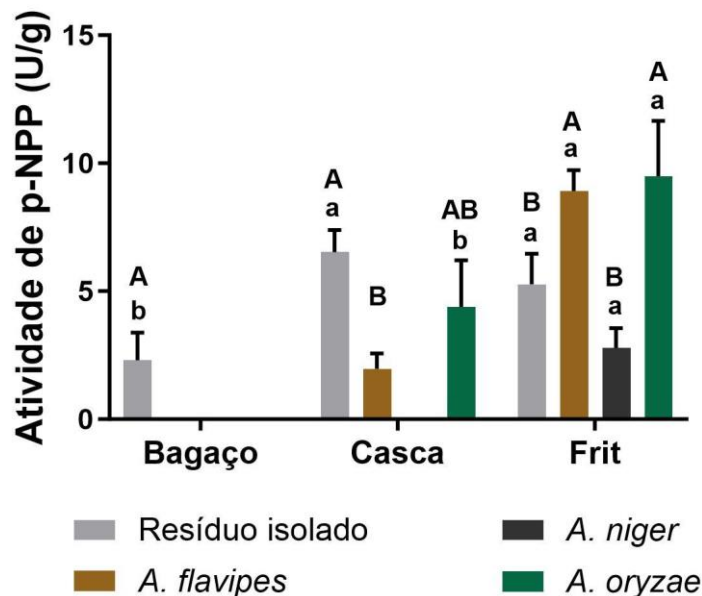


Figura 5. Atividade de lipase em substrato sintético p-NPP dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de *Aspergillus* sp.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Todos os resíduos de laranja isolados e fermentados apresentaram atividades de hidrólise do ácido graxo de cadeia curta p-NPB (Figura 6). Diferente do observado quando se usou p-NPL como substrato, todos os resíduos fermentados apresentaram atividade de lipase superior aos isolados. As maiores atividades de lipase foram observadas no bagaço combinado com *A. niger* (1.055,32 U/g), no bagaço fermentado com *A. oryzae* (857,03 U/g), e no frit fermentado com *A. oryzae* (922,24 U/g).

As atividades de lipase utilizando p-NPB no presente estudo foram até 2.253 vezes superiores às obtidas por Kupnik *et al.* (2021) que relataram a maior atividade da enzima no extrato etílico da casca da romã (*Punica granatum* L.) fresca (0,4682 U/ml). Esse perfil também se repetiu comparando as atividades da presente pesquisa com os estudos descritos por Savino *et al.* (2021) que produziram lipases em FES com farelo de trigo e *Cryphonectria parasitica* (2,55 U/g) (SAVINO *et al.*, 2021); por Oliveira *et al.* (2017) que conduziram FES com bagaço de azeitona suplementado com farelo de trigo e *Aspergillus ibericus* obtendo 223 U/g de atividade; e por Okino-Delgado *et al.* (2022) que combinou lipase fúngica com lipase de frit de laranja e obteve 28 U/ml. Somente

Camargo *et al.* (2022), utilizando frit de laranja como substrato para FES com *A. niger*, descreveu atividade superior às detectadas nesta pesquisa (2.127,6 U/g).

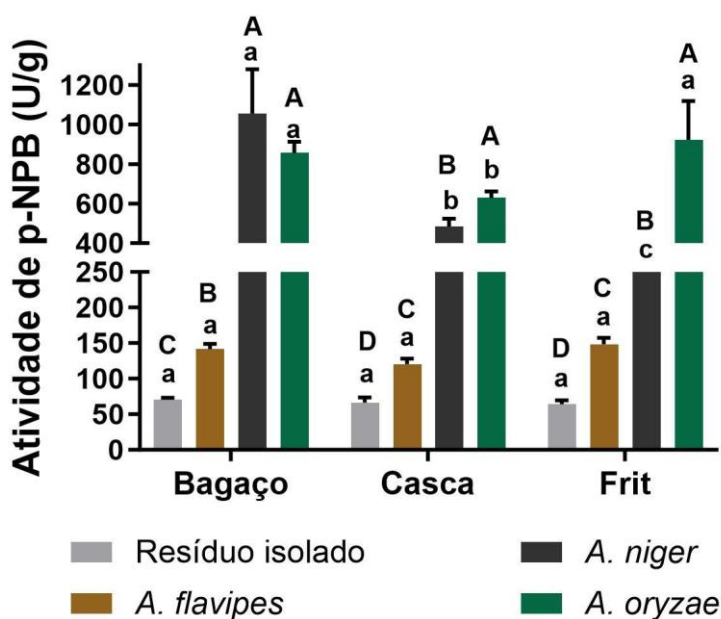


Figura 6. Atividade de lipase em substrato sintético p-NPB dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de *Aspergillus* sp.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Para além da detecção da atividade de lipase em diferentes substratos reacionais, que pode facilitar o direcionamento da aplicação da enzima (OKINO-DELGADO *et al.*, 2019), a importância está no fato das lipases obtidas de fontes vegetais não serem muito comuns no mercado de enzimas (CORRADINI *et al.*, 2019), sendo a do gérmen do trigo a única disponível comercialmente (KUBLICKI *et al.*, 2022). Levando em consideração que o gérmen do trigo é um alimento nobre e matéria-prima para diversos alimentos amplamente consumidos, é fundamental a busca de outras fontes de lipases vegetais (SANTOS *et al.*, 2013).

Lipases microbianas já são utilizadas na indústria de cosméticos (CHANDRA *et al.*, 2020) como ingrediente bioativo na limpeza superficial da pele, na constituição de óleos de banho, em cremes para redução de medidas e gordura localizada (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013), como substitutas a catalisadores químicos, na obtenção de ésteres usados em emulsões cosméticas (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021) e na

acilação entre ácidos graxos e vitaminas produzindo moléculas com alto poder antioxidante mais estáveis (KHAN; RATHOD, 2015).

3. Atividade de SOD

Todos os resíduos isolados e fermentados apresentaram atividade de SOD. O bagaço fermentado com *A. oryzae* (447,79 U/mg) e a casca combinada com *A. niger* (311,06 U/mg) apresentaram as maiores atividades desta enzima (Figura 7). Folhas da lima (*C. aurantifolia*) (151 U/g) (RAIESI; GOLMOHAMMADI, 2020) e folhas da laranja azeda (*C. aurantium* L.) (110 U/mg) (PARTIYA *et al.*, 2018), possuem atividades similares às observadas no bagaço de laranja isolado (121,65 U/mg). Atividade da mesma magnitude (134 U/mg) foi observada após fermentação submersa da bactéria marinha *Photobacterium leiognathi* seguido de procedimentos de concentração enzimática (BAFANA *et al.*, 2011).

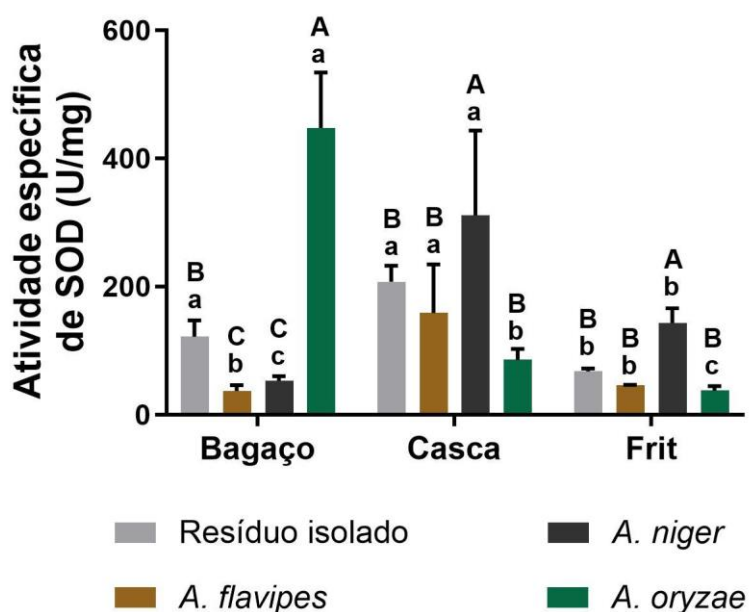


Figura 7. Atividade de SOD dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de *Aspergillus* sp.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

A Biocell-SOD® que foi produzida a partir da fermentação de levedura e formulada como um pó, apresenta cerca de 600 U/mg de atividade de SOD (SUNAR *et al.*, 2016), atividade desejada para um produto comercial purificado. O produto bruto da FES do bagaço combinado com *A. oryzae* do presente estudo apresentou atividade de SOD equivalente a 74% da SOD comercial. O potencial, especialmente do bagaço fermentado com *A. oryzae*, pode ser constatado quando comparado com outros trabalhos, pois apresentou atividade superior à encontrada por Ozdemir *et al.* (2022) que obteve 250 U/mg de atividade de SOD após fermentação de biomassa recuperada de *Bacillus cereus* e da encontrada por Sinha *et al.* (2022) que reportou atividade de SOD de 3,55 U/mg após FES com farelo de trigo e *Macrophomina phaseolina*. O bagaço fermentado por *A. flavipes* (37,09 U/mg) e o frit fermentado com *A. oryzae* (37,76 U/mg) apresentaram atividade de SOD em torno de 10 vezes superior à relatada por Sinha *et al.* (2022).

Outro fator importante, é que até o momento, dentre a literatura consultada, não há registros de atividade de SOD em resíduos de laranja do processamento de suco ou em produtos de FES utilizando *Aspergillus* sp.

As SOD são aplicadas em cosméticos como ativos antioxidantes de radicais livres liberados por exposição da pele à poluição e aos raios UV (SINGH, 2017; SUNAR *et al.*, 2016; LODS *et al.*, 2000), como hidratantes, protetores solares, cremes para clarear a pele, cremes para os olhos, esmaltes, sprays anti-queda capilar (BAFANA *et al.*, 2011), cremes faciais e batons (HANS *et al.*, 2008) e como nutricosméticos para colaborar com o sistema antioxidante protetor do metabolismo humano (YOUNUS, 2018; BARCLAY, 2007).

4. Aminas biogênicas e aminoácidos precursores

Os níveis de aminoácidos e aminas biogênicas encontrados nas amostras variaram nos diferentes tratamentos com os resíduos de laranja combinados com os fungos, o que torna esse resultado um possível marcador da interação com os microrganismos e da sua composição. As menores concentrações de aminas biogênicas, bem como, de alguns aminoácidos precursores foram detectadas no frit, como descrito nas tabelas a seguir. Entretanto, quando esse resíduo é fermentado com *A. oryzae*, apresenta os maiores níveis de L-triptofano (7.910,75 µg/g) (Tabela 2), serotonina (106,77 µg/g) e dopamina (1,50 µg/g) (Tabela 3). Valores altos de L-triptofano também são observados quando a casca da laranja é fermentada com esse fungo (6.191,56 µg/g). Em todos os resíduos

fermentados, independente do microrganismo, houve aumento de L-triptofano em relação ao resíduo isolado (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação de aminoácidos precursores nos resíduos de laranja isolados e fermentados.

Amostras	5-Hidroxitriptofano (µg/g)	L-Triptofano (µg/g)	Triptamina (µg/g)	L-Dopa (µg/g)
B	850,23 ± 1,55 ^a	284,95 ± 14,63 ^h	8,00 ± 0,57 ^f	0,066 ± 0,007 ^b
C	563,99 ± 46,55 ^b	408,54 ± 24,68 ^g	11,90 ± 0,86 ^e	0,107 ± 0,010 ^a
F	318,96 ± 22,40 ^c	247,66 ± 23,51 ^h	10,88 ± 0,07 ^e	0,025 ± 0,008 ^d
BF	460,83 ± 13,50 ^{cd}	2.488,21 ± 43,64 ^f	15,63 ± 0,90 ^d	0,029 ± 0,004 ^d
CF	484,87 ± 30,18 ^{bcd}	5.051,29 ± 317,62 ^c	10,32 ± 0,27 ^e	0,038 ± 0,002 ^{cd}
FF	314,63 ± 10,60 ^c	2.644,07 ± 48,47 ^{ef}	19,34 ± 1,49 ^{cd}	0,053 ± 0,0 ^b
BN	764,06 ± 58,04 ^a	2.619,65 ± 190,46 ^{ef}	32,00 ± 0,56 ^{ab}	0,094 ± 0,005 ^a
CN	456,77 ± 5,89 ^d	3.393,05 ± 6,81 ^d	18,25 ± 2,33 ^{cd}	0,028 ± 0,002 ^d
FN	349,63 ± 1,89 ^e	3.526,65 ± 1,26 ^d	43,30 ± 0,16 ^a	0,052 ± 0,0 ^{bc}
BO	536,17 ± 28,19 ^{bc}	2.915,68 ± 196,48 ^e	30,24 ± 5,51 ^b	0,055 ± 0,008 ^b
CO	466,46 ± 27,94 ^{cd}	6.191,56 ± 422,60 ^b	20,85 ± 1,92 ^c	0,054 ± 0,004 ^b
FO	229,97 ± 1,57 ^f	7.910,75 ± 105,90 ^a	32,55 ± 1,33 ^{ab}	0,055 ± 0,002 ^b

B – bagaço de laranja isolado, C – casca de laranja isolada, F – frit de laranja isolado, BF – bagaço fermentado com *A. flavipes*, CF – casca fermentada com *A. flavipes*, FF – frit fermentado com *A. flavipes*, BN – bagaço fermentado com *A. niger*, CN – casca fermentada com *A. niger*, FN – frit fermentado com *A. niger*, BO – bagaço fermentado com *A. oryzae*, CO – casca fermentada com *A. oryzae*, FO – frit fermentado com *A. oryzae*. ± Desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística na coluna no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Por outro lado, nenhum dos microrganismos usado na fermentação mostrou efeito em relação ao aumento dos níveis de 5-hidroxitriptofano (Tabela 2). A adição de microrganismos aos resíduos da laranja promoveu aumentos de triptamina, com destaque para o frit fermentado com *A. niger*, o qual mostrou os maiores valores de triptamina (43,30 µg/g) (Tabela 2). Aumento maior que 10 vezes no conteúdo de aminoácidos como o triptofano após a adição de microrganismos também foi descrita em soja por Serba *et al.* (2021) e Suprayogi *et al.* (2022). Esse aumento da disponibilidade de compostos benéficos pode ser uma forma simples de enriquecimento de alimentos ou mesmo para uso dos resíduos para outras finalidades, como pela indústria farmacêutica.

As folhas, a casca, o bagaço e as sementes de bergamota (*Citrus bergamia* Risso *et* Poit) foram estudadas quando a presença de triptamina. As concentrações mais altas

de triptamina foram observadas nas folhas (21-60 mg/kg). No bagaço 2-5 mg/kg e na casca 8-10 mg/kg (SERVILLO *et al.*, 2012), valores equivalentes proporcionalmente aos observados nos resíduos de laranja (bagaço e casca).

Tabela 3. Determinação de monoaminas nos resíduos de laranja isolados e fermentados.

Amostras	Serotonina (µg/g)	Dopamina (µg/g)	Histamina (µg/g)	Tiramina (µg/g)
B	13,96 ± 1,77 ^{ef}	0,39 ± 0,07 ^{gh}	23,45 ± 2,36 ^a	0,76 ± 0,05 ^h
C	11,82 ± 0,41 ^f	0,27 ± 0,10 ^{hi}	18,75 ± 1,12 ^{bcd}	71,80 ± 4,32 ^a
F	11,58 ± 0,01 ^f	0,18 ± 0,05 ⁱ	11,30 ± 0,65 ^g	44,71 ± 0,13 ^b
BF	6,87 ± 0,27 ^g	0,70 ± 0,03 ^{ef}	21,02 ± 0,25 ^{abc}	6,71 ± 0,08 ^e
CF	44,21 ± 5,40 ^{bc}	0,51 ± 0,04 ^{fg}	14,69 ± 1,17 ^{ef}	5,12 ± 0,27 ^f
FF	27,85 ± 4,68 ^d	0,39 ± 0,02 ^{gh}	15,62 ± 0,17 ^{def}	1,39 ± 0,04 ^g
BN	16,03 ± 2,60 ^e	1,31 ± 0,01 ^b c	13,00 ± 1,46 ^{fg}	4,35 ± 0,39 ^f
CN	24,67 ± 3,05 ^d	1,00 ± 0,08 ^d	13,86 ± 0,71 ^f	6,13 ± 0,09 ^e
FN	30,93 ± 2,83 ^{cd}	0,85 ± 0,0d ^e	24,54 ± 0,38 ^a	6,94 ± 0,14 ^e
BO	42,77 ± 4,52 ^{bc}	1,67 ± 0,19 ^a	22,86 ± 2,38 ^{ab}	13,42 ± 1,70 ^d
CO	68,78 ± 16,31 ^{ab}	1,05 ± 0,01 ^c d	17,22 ± 0,01 ^{cde}	18,39 ± 0,01 ^c
FO	106,77 ± 19,51 ^a	1,50 ± 0,13 ^a b	15,8 3± 1,04 ^{def}	7,04 ± 0,23 ^e

B – bagaço de laranja isolado, C – casca de laranja isolada, F – frit de laranja isolado, BF – bagaço fermentado com *A. flavipes*, CF – casca fermentada com *A. flavipes*, FF – frit fermentado com *A. flavipes*, BN – bagaço fermentado com *A. niger*, CN – casca fermentada com *A. niger*, FN – frit fermentado com *A. niger*, BO – bagaço fermentado com *A. oryzae*, CO – casca fermentada com *A. oryzae*, FO – frit fermentado com *A. oryzae*. ± Desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística na coluna no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O triptofano é essencial para a formação de serotonina, a qual não ultrapassa a barreira hematoencefálica, no entanto, está associado à promoção de bem-estar, além de ser um aminoácido essencial para a biossíntese de proteínas. Para a síntese de serotonina, duas vias podem ocorrer. Em animais, L-triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano pela ação da triptofano hidroxilase (TPH), o 5-hidroxitriptofano é catalisado pela ação da enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) que forma serotonina (TAN *et al.*, 2016). A L-triptofano descarboxilase converte L-triptofano em triptamina em plantas, a qual é convertida em serotonina através da 5-hidroxilase (T5H) (ZHAO *et al.*, 2019). Após a adição dos fungos aos resíduos da laranja, os níveis de serotonina aumentaram

consideravelmente, exceto quando o bagaço foi fermentado com *A. flavipes* (6,87 µg/g) (Tabela 3).

Apesar da serotonina não atravessar a barreira hematoencefálica e atuar no sistema periférico, essa amina biogênica tem alta atividade antioxidante, protegendo a bicamada lipídica das membranas (AZOUZI *et al.*, 2017). Além disso, a serotonina é precursora da melatonina (GALANO *et al.*, 2011), que em ensaios *in vitro* demonstrou proteção contra raios UVB na cultura primária de fibroblastos (LEE *et al.*, 2003). Devido ao conteúdo encontrado nos resíduos enriquecidos com os fungos, esse material poderia ser usado na indústria farmacêutica, como um cosmético na eliminação de radicais livres. Vale ressaltar que devido a obtenção dos produtos fermentados não usar processamento térmico (altas temperaturas), não houve degradação da serotonina, já que outros estudos demonstram que tratamentos com aquecimento induzem a diminuição dos níveis dessa amina biogênica (HANO *et al.*, 2017).

Tabela 4. Determinação de diaminas nos resíduos de laranja isolados e fermentados.

Amostras	Putrescina (µg/g)	Cadaverina (µg/g)
B	320,48 ± 6,14 ^a	3,68 ± 0,43 ^{gh}
C	124,33 ± 8,52 ^c	8,14 ± 1,00 ^d
F	49,72 ± 1,01 ^f	1,78 ± 0,31 ^h
BF	314,79 ± 3,49 ^a	4,49 ± 0,26 ^{fg}
CF	171,66 ± 14,86 ^b	13,99 ± 0,69 ^b
FF	109,41 ± 15,13 ^{cd}	5,15 ± 0,24 ^{fg}
BN	136,67 ± 12,61 ^{bc}	5,89 ± 0,53 ^{ef}
CN	69,05 ± 5,81 ^e	11,04 ± 0,04 ^c
FN	67,29 ± 1,77 ^e	11,01 ± 0,40 ^c
BO	159,76 ± 20,63 ^b	7,39 ± 0,89 ^{de}
CO	96,66 ± 5,63 ^d	19,15 ± 1,23 ^a
FO	50,75 ± 2,52 ^f	18,36 ± 0,79 ^a

B – bagaço de laranja isolado, C – casca de laranja isolada, F – frit de laranja isolado, BF – bagaço fermentado com *A. flavipes*, CF – casca fermentada com *A. flavipes*, FF – frit fermentado com *A. flavipes*, BN – bagaço fermentado com *A. niger*, CN – casca fermentada com *A. niger*, FN – frit fermentado com *A. niger*, BO – bagaço fermentado com *A. oryzae*, CO – casca fermentada com *A. oryzae*, FO – frit fermentado com *A. oryzae*. ± Desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística na coluna no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Os maiores conteúdos de L-dopa foram encontrados nas cascas de laranja (0,107 µg/g) e em bagaço com *A. niger* (0,094 µg/g) (Tabela 2). Nos resíduos enriquecidos com fungos, o conteúdo de dopamina foi maior no bagaço e frit com *A. oryzae* (1,67 e 1,50 µg/g, respectivamente) (Tabela 3). O L-dopa é um aminoácido encontrado em plantas com função alelopática, uma forma de adaptação bioquímica defensiva (SOARES *et al.*, 2014) e é substrato para a formação de dopamina, por exemplo, L-dopa pode atravessar a barreira hematoencefálica e nas células nervosas é descarboxilado para dopamina, importante catecolamina na supressão da neurodegeneração (JODKO-PIÓRECKA; LITWINIENKO, 2015). Apesar de a dopamina não atravessar a barreira hematoencefálica, essa catecolamina tem sido relacionada à eliminação de radicais livres, agindo como antioxidante (COSENTINO *et al.*, 2004). A dopamina também ocorre em plantas e o conteúdo aumenta em resposta à agentes estressores, o que pode indicar sua ação em eliminar EROS e em *Citrus sinensis* os níveis estão próximos à 1 µg/g (LIU *et al.*, 2020). Nos resíduos de laranja a presença dos fungos *A. niger* e *A. oryzae* aumentou o conteúdo dessa amina.

O composto sintético conjugado N-nicotinoil dopamina apresentou ação antioxidante *in vitro* reduzindo mais de 60% do radical DPPH na concentração de 1000 µM. No teste *in vitro* com o modelo de epiderme humana reconstruída (MEL-300-B), o N-nicotinoil (0,1%) apresentou atividade de despigmentação de manchas induzidas na pele, posteriormente, na mesma concentração o composto foi avaliado em testes de sensibilidade de pele por estudos clínicos em humanos e não foram registrados sinais de sensibilidade (KIM *et al.*, 2011). Os resíduos de laranja são fonte de L-dopa e dopamina e a adição de fungos pode aumentar a concentração desses compostos, tornando esses produtos fontes de aminas biogênicas com ação antioxidante, atividade biológica potencial para a prevenção de danos oxidativos na pele, que podem ser recuperadas e de interesse da indústria cosmética.

Tanto no bagaço, como na casca de laranja, mesmo após a fermentação por *A. flavipes*, a agmatina não foi detectada. Por outro lado, quando o bagaço foi fermentado com *A. niger* ou *A. oryzae*, essa amina ocorreu em níveis consideráveis (BN = 187,43 µg/g e BO = 184,55 µg/g) (Tabela 5). Em algumas plantas, agmatina também não foi detectada (amendoim, pistache, batata e batata-doce) e devido ao baixo teor ou sua ausência em alimentos de origem vegetal, pode ser improvável que ela seja uma fonte de aminas biogênicas na dieta (HOU *et al.*, 2019). Entretanto, com a adição dos fungos, o aumento notado neste estudo pode ser um resultado interessante para a elaboração de

produtos ricos nessa amina. Agmatina está relacionada com o metabolismo de glicose, na liberação de insulina e com o estímulo da secreção de adrenalina e noradrenalina (GALGANO *et al.*, 2012), além de ser considerada um neuromodulador endógeno e ser relacionada com a promoção de efeitos antidepressivos (VALVERDE *et al.*, 2021). Assim, outro benefício encontrado neste trabalho é a possibilidade de ingestão de alimentos ricos em agmatina, com propriedades fitoterápicas importantes para o bem-estar.

Tabela 5. Determinação de poliaminas nos resíduos de laranja isolados e fermentados.

Amostras	Agmatina (µg/g)	Espermidina (µg/g)	Espermina (µg/g)
B	*Nd	4,65 ± 0,22 ^e	0,92 ± 0,12 ^b
C	Nd	4,65 ± 0,48 ^e	0,67 ± 0,13 ^{bcd}
F	54,56 ± 1,55 ^{cd}	3,09 ± 0,43 ^f	0,45 ± 0,08 ^d
BF	Nd	13,24 ± 0,45 ^b	0,57 ± 0,04 ^{cd}
CF	Nd	8,29 ± 0,72 ^c	1,33 ± 0,14 ^a
FF	58,77 ± 2,58 ^{bc}	6,39 ± 0,04 ^d	1,32 ± 0,03 ^a
BN	187,43 ± 14,71 ^a	18,40 ± 1,54 ^a	0,56 ± 0,08 ^{cd}
CN	70,09 ± 2,05 ^b	6,92 ± 0,20 ^{cd}	0,56 ± 0,06 ^{cd}
FN	62,97 ± 0,18 ^{bc}	6,55 ± 0,11 ^d	0,57 ± 0,02 ^{cd}
BO	184,55 ± 15,96 ^a	18,34 ± 1,44 ^a	1,52 ± 0,14 ^a
CO	21,72 ± 2,35 ^e	7,40 ± 0,32 ^{cd}	1,27 ± 0,11 ^a
FO	45,01 ± 5,65 ^d	4,60 ± 0,03 ^e	0,77 ± 0,07 ^{bc}

B – bagaço de laranja isolado, C – casca de laranja isolada, F – frit de laranja isolado, BF – bagaço fermentado com *A. flavipes*, CF – casca fermentada com *A. flavipes*, FF – frit fermentado com *A. flavipes*, BN – bagaço fermentado com *A. niger*, CN – casca fermentada com *A. niger*, FN – frit fermentado com *A. niger*, BO – bagaço fermentado com *A. oryzae*, CO – casca fermentada com *A. oryzae*, FO – frit fermentado com *A. oryzae*. ± Desvio padrão. *Nd – Não detectado. Letras iguais não apresentam diferença estatística na coluna no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Agmatina é precursora de putrescina, uma diamina associada à deterioração causada por microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Lactobacillus hilgardii* (LANDETE *et al.*, 2008). Os níveis de putrescina diminuíram quando os resíduos da laranja foram fermentados, exceto para o bagaço fermentado com *A. flavipes*. Esse resultado pode ser um indicativo interessante da segurança alimentar dos produtos à base de casca e frit de laranja fermentados com fungos. Por outro lado, não só os níveis de putrescina devem ser levados em conta

principalmente em alimentos fermentados, devido aos possíveis efeitos tóxicos de ambas as diaminas. A cadaverina foi detectada em todas as amostras, porém a fermentação da casca e do frit com *A. oryzae* resultaram nas maiores concentrações (19,15 e 18,36 µg/g, respectivamente) (Tabela 4). Entretanto, a utilização de 100 g dos produtos, não seriam capazes de promover efeitos indesejados, como possíveis intoxicações/alergias. Ainda não há dados sobre respostas às doses em humanos, mas de acordo o estudo de Til et al. (1997) com ratos Wistar, o Nível de Efeito Adverso Não Observado, do inglês *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) é de 2.000 ppm, ou 180 mg/kg de peso corporal/dia. Dessa forma, baseando-se nesse estudo, o produto elaborado não causaria danos toxicológicos após seu consumo.

Apesar da putrescina e a cadaverina terem efeitos negativos, como indução de necrose, outras aminas são importantes em relação à efeitos danosos para o organismo como a histamina e a tiramina, as quais tem efeito indutor de necrose muito maior (LINARES *et al.*, 2016). Nos produtos fermentados observou-se a diminuição dos níveis de histamina e tiramina. O bagaço e a casca, apesar de conterem valores altos de 5-hidroxitriptofano e L-dopa, respectivamente, contêm os maiores níveis de histamina e putrescina. Entretanto, vale destacar que a fermentação dos resíduos com os microrganismos foi eficaz na diminuição do conteúdo dessas aminas consideradas tóxicas. Não existem ainda normas que definem o limite de histamina e tiramina em alimentos, exceto para peixes e produtos à base de peixe em relação à histamina (DEL RIO *et al.*, 2019).

A amina biogênica tiramina é considerada maléfica, quando consideramos sua ingestão, no entanto, nos tratamentos com casca e frit a fermentação diminuiu a concentração de tiramina (Tabela 3), o que sugere a FES como potencial ferramenta para reduzir a concentração de aminas biogênicas indesejáveis para alguns produtos.

Porém a tiramina foi descrita como ingrediente bioativo por uma patente francesa (WO2004002941 bioatiA1, 2004) na formulação de cosméticos. Kim *et al.* (2008) descreveu a polpa da fruta madeira-maçã (*Limonia acidissima* L.) como fonte de tiramina, aplicada também como matéria prima de cosmético para remover pequenas manchas e lesões que aparecem na pele. O composto sintético conjugado N-nicotinoil tiramina apresentou atividade clareadora da pele em testes *in vitro*, Kim *et al.* (2015) sugerem o composto como potencial ativo para cosméticos e tratamentos dermatológicos. O bagaço de laranja apresentou a maior concentração de tiramina (71,80 µg/g), corroborando com o estudo de Servillo *et al.* (2017) que avaliou várias espécies de *Citrus* sp. quanto a

presença de tiramina e seus derivados, e observaram que as folhas e o suco da espécie *Citrus sinensis* apresentaram 100 e 40% de concentração relativa de tirosina, respectivamente, as maiores concentrações observadas em relação às outras espécies testadas.

Espermidina e espermina são derivadas de putrescina e espermidina, e ocorrem em maiores níveis em produtos de origem vegetal, enquanto a espermina é geralmente predominante em produtos de origem animal (MUÑOZ-ESPARZA *et al.*, 2019). Os resíduos de laranja fermentado com fungos apresentaram os maiores níveis de ambas poliaminas e comparativamente, espermidina é a poliamina majoritária entre as duas, confirmando sua ocorrência em maiores níveis em produtos de origem vegetal. O conteúdo de espermidina atinge 18,40 e 18,34 µg/g em bagaço fermentado com *A. niger* e bagaço fermentado com *A. oryzae*, respectivamente (Tabela 5). Tanto espermidina, como espermina apresentam potencial antioxidante, auxiliando na remoção de radicais livres, principalmente espermina e ambas são descritas por apresentarem capacidade de eliminar radicais livres maior que antioxidantes já conhecidos como octilgalato, alfa-tocoferol, palmitato de ascorbila ou terc-butilhidroquinona, entre outros (MUÑOZ-ESPARZA *et al.*, 2019). Além da atividade antioxidante de ambas as aminas, a espermidina é relacionada com diminuição do processo de envelhecimento, pois promove autofagia, com a remoção de proteínas e organelas danificadas das células (EISENBERG *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos aborda os conteúdos de aminas biogênicas para classificar o valor nutricional, presença de contaminantes e frescor dos alimentos. Em frutas, sucos e vegetais frescos as mais encontradas são tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, espermina e espermidina (PAPAGEORGIU *et al.*, 2018), todas foram observadas nos resíduos de laranja isolados e fermentados. Os índices CQI e BAI foram propostos para avaliar o conteúdo delas em alimentos de origem animal (BASÍLIO *et al.*, 2022; WÓJCIK *et al.*, 2021). No entanto, esses índices são extrapolados e usados para determinar a qualidade de outros alimentos, como sucos e vinhos (NETO *et al.*, 2023; GOMEZ *et al.*, 2020). Alañón *et al.* (2017) propôs que as concentrações aceitáveis de histamina e tiramina para sucos de fruta é de 8 e 25-40 mg/L, respectivamente, sendo considerados produtos com condições higiênico-sanitárias adequadas e seguros para consumo.

Tabela 6. Determinação do índice de qualidade das aminas biogênicas dos resíduos de laranja isolados e fermentados.

Amostras	CQI (µg/g)	BAI (µg/g)	AI (µg/g)
B	58,11 ± 3,24 ^a	348,37 ± 8,01 ^a	19,30 ± 1,29 ^a
C	25,07 ± 0,84 ^b	223,02 ± 4,07 ^b	13,02 ± 0,07 ^c
F	14,49 ± 1,23 ^{ef}	107,50 ± 1,23 ^{ef}	7,11 ± 0,11 ^d
BF	21,06 ± 0,39 ^c	347,01 ± 3,07 ^a	15,27 ± 0,36 ^b
CF	21,13 ± 0,17 ^c	205,46 ± 16,99 ^b	3,87 ± 0,13 ^{ef}
FF	17,08 ± 1,97 ^d	131,57 ± 15,14 ^{de}	3,78 ± 0,24 ^{efg}
BN	7,56 ± 0,04 ^h	159,90 ± 14,98 ^c	4,34 ± 0,49 ^e
CN	11,44 ± 0,46 ^g	100,07 ± 6,64 ^f	3,22 ± 0,29 ^{fgh}
FN	13,25 ± 0,04 ^f	109,79 ± 1,14 ^{ef}	2,86 ± 0,19 ^h
BO	10,23 ± 0,20 ^g	216,02 ± 11,70 ^b	3,20 ± 0,18 ^{gh}
CO	15,62 ± 0,24 ^{de}	151,42 ± 6,87 ^{cd}	1,85 ± 0,16 ⁱ
FO	14,73 ± 1,02 ^{def}	90,50 ± 6,07 ^f	0,75 ± 0,02 ^j

B – bagaço de laranja isolado, C – casca de laranja isolada, F – frit de laranja isolado, BF – bagaço fermentado com *A. flavipes*, CF – casca fermentada com *A. flavipes*, FF – frit fermentado com *A. flavipes*, BN – bagaço fermentado com *A. niger*, CN – casca fermentada com *A. niger*, FN – frit fermentado com *A. niger*, BO – bagaço fermentado com *A. oryzae*, CO – casca fermentada com *A. oryzae*, FO – frit fermentado com *A. oryzae*. CQI – Chemical Quality Index (Índice de Qualidade Química), BAI – Biogenic Amines Index (Índice de Aminas Biogênicas), AI – Amine Index (Índice de Aminas). ± Desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferença estatística na coluna no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O índice BAI calcula a soma das aminas histamina, tiramina, putrescina e cadaverina, no entanto, é bastante específico para cada alimento, Loret *et al.* (2005) propôs um índice BAI específico para cervejas e considerou adicionar outras aminas biogênicas no cálculo (triptamina, agmatina e feniletilamina) (DANQUAH *et al.*, 2012). Basílio *et al.* (2022) desenvolveu o índice de aminas (Amine Index - AI) que divide a soma dos valores das aminas consideradas malélicas a saúde, que indicam contaminantes ou estado avançado de deterioração (histamina, tiramina, putrescina e cadaverina), pelo valor da soma das aminas consideradas promotoras de bem-estar (dopamina, serotonina, melatonina, espermidina e espermina), para avaliar o conteúdo de aminas biogênicas de origem vegetal e propôs um índice de segurança de até 50 mg/L, ao qual as amostras testadas permaneceram dentro do limite (Tabela 6).

Os produtos obtidos dos resíduos de laranja isolados e fermentados não estão sendo considerados para consumo direto neste estudo, e sim como ingredientes para

produtos cosméticos. No entanto, estar dentro do limite pré-estabelecido para a concentração dessas moléculas é um indicativo de segurança, que pode ser usado como ponto de partida para outros estudos.

5. Compostos fenólicos

Todos os resíduos de laranja isolados e fermentados apresentaram fenóis totais. O bagaço fermentado com *A. flavipes* (911,41 mg AGE/100g) e com *A. oryzae* (967,76 mg AGE/100g), bem como o frit fermentado com *A. niger* (975,88 mg AGE/100g) e com *A. oryzae* (909,08 mg AGE/100g) apresentaram as maiores concentrações (Figura 8). Os resíduos industriais da produção do suco de damasco (*Prunus armeniaca* L.) foram utilizados como substrato para FES com os fungos *A. niger* e *R. oligosporus*. A maior concentração ocorreu com o segundo fungo totalizando 200 mg AGE/100g de fenóis totais (DULF et al., 2017), resultados estes inferiores para todos os resíduos isolados e fermentados obtidos na presente pesquisa que apresentou incrementos de 24 a 105% na concentração de fenóis totais após FES.

Extratos etílicos de casca e semente de romã (*P. granatum*) liofilizados apresentaram 1.676,13 e 2.016,62 mg AGE/100g de fenóis totais, respectivamente (KUPNIK et al., 2021), representando valor quatro vezes superior às observadas na casca de laranja isolada (520,86 mg AGE/100g) e cerca de 3 vezes em relação à casca fermentada com *A. oryzae* (607,22 mg AGE/100g). Já os resíduos obtidos manualmente da toranja (*Citrus grandis* L. Osbeck) apresentaram no flavedo e no albedo, respectivamente, 1.160,08 e 1.876,19 mg AGE/100g (RAHMAN et al., 2018), ao contrário do que foi obtido no presente estudo uma vez que no frit (flavedo) e no bagaço (albedo), observou-se nesta ordem, 667,42 e 470,52 mg AGE/100g de fenóis totais. Resíduos, não separados em frações, obtidos do processamento do suco de laranja e da pectina de laranja apresentaram, respectivamente, 386 e 170 mg AGE/100g de fenóis totais (BARBOSA et al., 2018), concentrações estas próximas às encontradas nos resíduos isolados do presente estudo - a casca isolada, por exemplo, apresentou 520,86 mg AGE/100g.

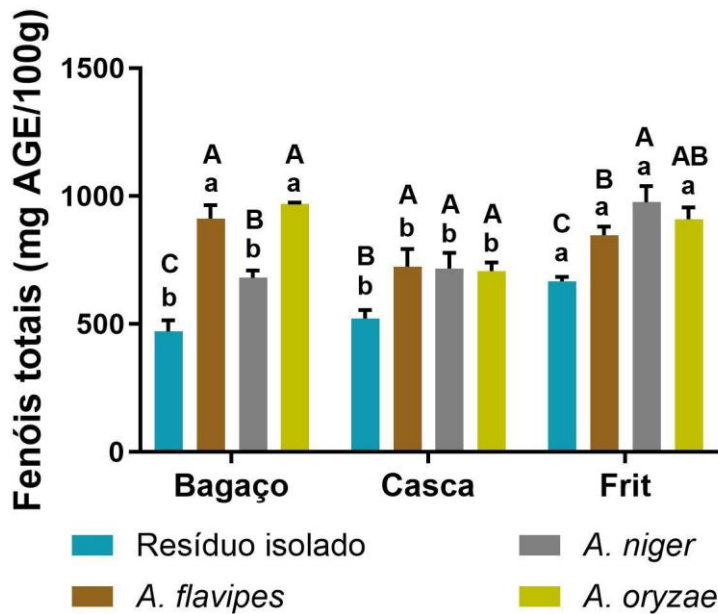


Figura 8. Teor de fenóis totais dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de *Aspergillus* sp.

Ácido Gálico Equivalente (AGE). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O produto da FES do arroz combinado com *A. oryzae* apresentou incremento de fenóis totais de aproximadamente 40 mg AGE/100g após fermentação quando comparado com o arroz isolado (3 mg AGE/100g) (LEE *et al.*, 2016). O padrão de incremento também foi observado para os resíduos de laranja após FES, no entanto, foram na ordem de 165,95 mg AGE/100g. Os resíduos de laranja isolados já são fonte de compostos fenólicos, e conforme descrito por Xue *et al.* (2022), indicamos também o aumento da biodisponibilidade de compostos fenólicos após a FES de cascas de laranja com *A. niger*.

Todos os resíduos de laranja isolados e fermentados apresentaram concentrações de flavonoides totais. As maiores concentrações ocorreram no frit fermentado com *A. niger* (1.027,73 mg QE/100g) e com *A. oryzae* (1.130,44 mg QE/100g) (Figura 9). Estudos da literatura como o de Dulf *et al.* (2017) demonstram que a FES incrementou a concentração de flavonoides utilizando resíduos da produção do suco de damasco (*P. armeniaca* L.) combinados com dois fungos. Inicialmente a concentração de flavonoides totais dos resíduos foi de 26 mg QE/100g e após a FES com *A. niger* foi de 29 mg QE/100g e com *R. oligosporus* foi de 36 mg QE/100g. Em outro estudo realizado com os resíduos

de ameixa (*Prunus domestica* L.) a FES também aumentou o conteúdo de flavonoides totais em 150 mg QE/100g em relação ao resíduo isolado (DULF *et al.*, 2016). Os produtos de FES com os resíduos de laranja apresentaram incremento de até 381,11 mg QE/100g, valor de 254% de flavonoides totais em relação aos dados reportados por Dulf *et al.* (2016).

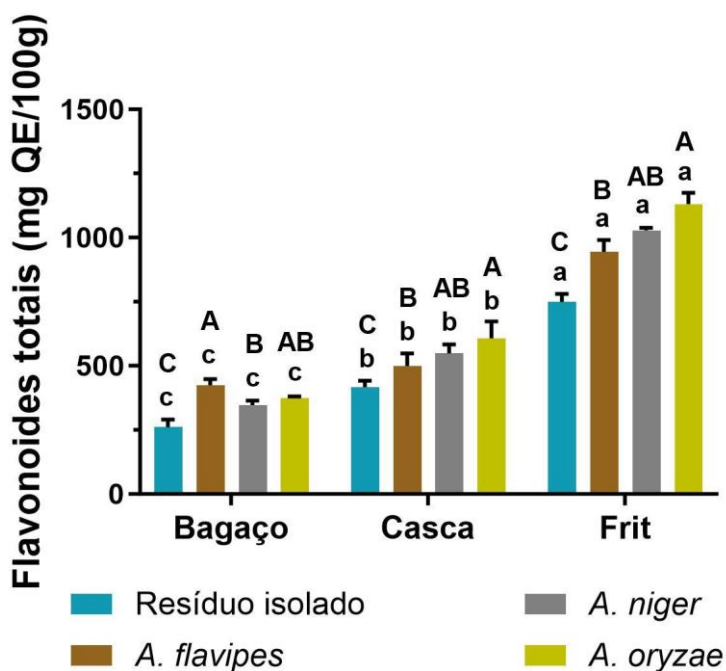


Figura 9. Flavonoides totais dos resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de *Aspergillus* sp.

Quercetina Equivalente (QE). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O frit isolado e fermentado apresentou as maiores concentrações de flavonoides totais, seguido pela casca isolada e fermentada e bagaço isolado e fermentado (Figura 9). Addi *et al.* (2022) reportaram a presença de flavonoides em todas as partes de frutas cítricas, com maiores concentrações na casca de *Citrus* sp. (ADDI *et al.*, 2022), o que corrobora com a função fisiológica dos flavonoides na casca de vegetais na proteção contra estresses abióticos e bióticos (BERMEJO *et al.*, 2011).

A casca fresca de limão doce (*Citrus limetta*), obtida manualmente, apresentou a maior concentração de flavonoides totais (1.800 mg QE/100g) em relação à casca seca à vácuo (1.500 mg QE/100g) (SURI *et al.*, 2022), sendo que ambos os resultados são em torno de três vezes maior em relação à casca de laranja isolada (416,59 mg QE/100g), que no presente estudo foi liofilizada. No entanto, Nishad *et al.* (2019) detectaram 104 mg QE/100g de flavonoides totais para resíduos de laranja, sendo inferior em torno de quatro vezes ao conteúdo da casca de laranja isolada. Apesar dos dados serem referentes a diferentes espécies de *Citrus* sp., os processos de obtenção e secagem podem influenciar na concentração desses compostos.

Oiken *et al.* (2020) reportaram também altas concentrações de flavonoides totais (5.994 mg QE/100g) para a casca da laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), colhidas e processadas manualmente no mesmo dia. Segundo Deng *et al.* (2014) há diminuição da concentração de flavonoides de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck) dias após colheita.

É importante ressaltar que na presente pesquisa os resíduos de laranja passaram por processamento industrial para a obtenção do suco da fruta e mesmo assim apresentaram flavonoides. Ademais, os resíduos de laranja isolados somados apresentam teores de flavonoides totais de 1.658,81 mg QE/100g, concentrações classificadas como altas pelos estudos de Oikeh *et al.* (2020) e Anticono *et al.* (2020).

Em cosméticos, em geral, os polifenóis são utilizados como antioxidantes, para evitar a deterioração de formulações e como agentes fotoprotetores (CHERUBIM *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2018). Dentre os polifenóis, os flavonóides são amplamente utilizados como nutricosméticos com ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, proteção-UV e selante capilar (ADAMSKA-SZEWCZYK; ZGÓRKA, 2019; HENRIQUE; LOPES, 2019).

6. Avaliação dos resíduos de laranja isolados e fermentados em testes *in vitro* de atividade biológica

Os resíduos de laranja isolados e fermentados apresentaram uma gama de moléculas e compostos bioativos. A partir desses resultados foram propostos alguns testes *in vitro* iniciais para avaliar o potencial biológico dos resíduos de laranja isolados e fermentados que possam ser de interesse para aplicação em cosméticos. Os dados estão apresentados e discutidos a seguir.

6.1. Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Todos os resíduos isolados e fermentados apresentaram atividades antioxidantes pelos métodos ABTS e DPPH (Figuras 10 e 11). Importante lembrar que ABTS e DPPH são radicais sintéticos que apresentam coloração característica azul esverdeado e roxo, respectivamente, e a atividade antioxidante é medida através do grau de descoloração, por consequência, redução desses radicais livres (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Para a atividade antioxidante com o radical ABTS, o bagaço e casca fermentados com *A. flavipes* (11.221,0 e 10.366,0 $\mu\text{mol TE/g}$, respectivamente), o frit fermentado com *A. niger* (10.988,0 $\mu\text{mol TE/g}$) e com *A. oryzae* (11.521,0 $\mu\text{mol TE/g}$) apresentaram as maiores atividades antioxidantes (Figura 10).

Teixeira *et al.* (2022) determinaram a atividade antioxidante do fruto verde da acerola (*Malpighia emarginata*), resíduo descartado no processo da seleção pós-colheita, na forma de extrato liofilizado que apresentou 1.597,0 $\mu\text{mol TE/g}$ para o radical ABTS. A casca da laranja doce (*C. sinensis*) obtida manualmente apresentou 304,05 $\mu\text{mol TE/100g}$ de atividade antioxidante (CASQUETE *et al.*, 2015) e os resíduos do limão (*Citrus limon* L.), incluindo casca e sementes, obtidos após a produção industrial do suco, apresentaram 0,46 mg TE/g de atividade antioxidante (PAPOUTSIS *et al.*, 2016). Esses valores são inferiores, em $\mu\text{mol TE/g}$, aos encontrados no presente estudo para os resíduos isolados de laranja (6.487,78 para bagaço, 7.498,89 para casca e 8.254,44 para frit) e similares aos obtidos para os resíduos da produção industrial do suco de toranja (*Citrus paradisi* L), sendo que o flavedo apresentou 8.970,00 e o albedo 5.000,00 (STABRAUSKIENE *et al.*, 2023).

Cascas de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) foram submetidas a FES mista com os microrganismos *A. niger* e *Trichoderma reesei* e o produto resultante apresentou atividade antioxidante pelo método ABTS (4,10 $\mu\text{mol TE/g}$) três vezes maior do que a amostra sem fermentação (0,96 $\mu\text{mol TE/g}$) (XUE *et al.*, 2022). O bagaço de laranja fermentado por *A. flavipes* apresentou aumento da atividade antioxidante em relação ao resíduo isolado de 72,9%. Para os outros resíduos, casca e frit, o incremento das atividades antioxidantes após FES foram menos expressivos, ficando entre 14,6 e 52,7%. Após a FES de duas variedades de sorgo com *A. niger*, Espitia-Hernández *et al.* (2022) observaram 61,67 e 63,00 mg TE/100 g de atividade antioxidante para o radical ABTS, valores inferiores aos observados no presente estudo. Já os produtos da FES com a semente de abacate (*Persea americana* Mill cv. Hass) com *A. niger* apresentaram

1.361,57 mg TE/g, valor superior aos observados para os resíduos de laranja após FES (YEPES-BETANCUR *et al.*, 2021).

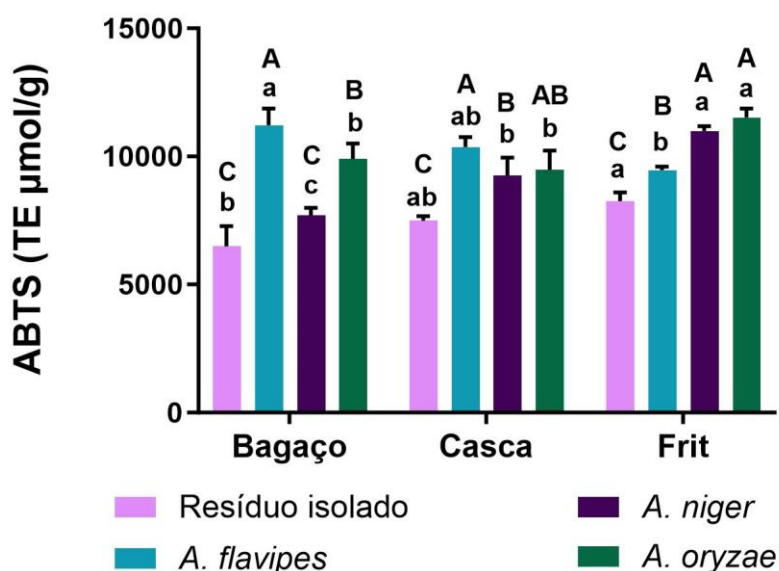


Figura 10. Atividade antioxidante, determinada com o radical ABTS, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de *Aspergillus* sp.

Trolox Equivalente (TE). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

No teste com o radical DPPH o bagaço apresentou as maiores atividades antioxidantes (em $\mu\text{mol TE/g}$), a saber: 11.505,68 para o bagaço isolado, 11.030,41 para o bagaço fermentado com *A. flavipes* e 11.325,85 $\mu\text{mol TE/g}$ para o bagaço fermentado com *A. oryzae*. Esses resultados não apresentaram diferença estatística para a casca fermentada com *A. flavipes* (10.490,91 $\mu\text{mol TE/g}$), sendo, portanto, incluída nos melhores resultados (Figura 11).

O extrato liofilizado da acerola verde apresentou capacidade antioxidante de 161,3 $\mu\text{mol TE/100 mg}$ para o teste do DPPH (TEIXEIRA *et al.*, 2022), enquanto a casca da laranja doce (*C. sinensis*) apresentou 102,39 $\mu\text{mol TE/100 g}$ (Casquette *et al.*, 2015), e o resíduo industrial da obtenção de pectina da laranja, 2.571,0 $\mu\text{mol TE/g}$. Resultados similar e superior a este último estudo, foram observados, respectivamente, para o frit de laranja isolado (1.871,77 $\mu\text{mol TE/g}$) e para a casca de laranja isolada (6.483,20 $\mu\text{mol TE/g}$).

TE/g). Os resíduos de toranja divididos em flavedo e albedo, apresentaram, respectivamente, 90 e 93% de redução do radical DPPH (RAHMAN *et al.*, 2018). Valor similar foi observado para casca de romã (90,4%) (KUPNIK *et al.*, 2021), os quais são próximos aos observados para o bagaço de laranja isolado (93,3%) no presente estudo.

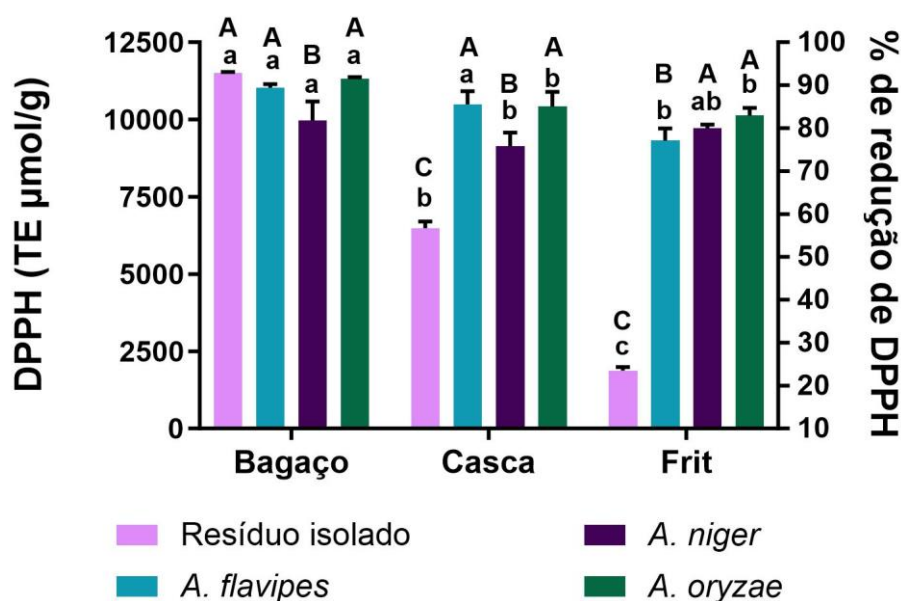


Figura 11. Atividade antioxidante, determinada com o radical DPPH, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de *Aspergillus* sp.

Trolox Equivalente (TE). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

XUE *et al.* (2022) observaram atividade antioxidante para o radical DPPH da casca de laranja sem fermentação de 12,96 μmol TE/g e após a FES mista com o mesmo substrato e com *A. niger* e *T. reesei*, de 30,97 μmol TE/g, representando um aumento 138% na atividade. Todas as amostras com casca e frit de laranja fermentados, no presente estudo, apresentaram aumento quanto às atividades antioxidantes em relação ao resíduo isolado – em torno de até cinco vezes. Os produtos de FES de sementes de abacate com *A. niger* (19.170,0 μmol TE/g) (YEPES-BETANCUR *et al.*, 2021) apresentaram atividades antioxidantes pouco superiores às observadas no presente estudo. No entanto, o produto de FES com sorgo e o mesmo fungo apresentaram (1.336,7 μmol TE/g), valor inferior aos observados para os resíduos de laranja isolados e fermentados (ESPITIA-

HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). Os resíduos industriais de borra de chá foram utilizados como substratos para FES com *A. niger* e *Trichoderma koningii* e apresentaram capacidade antioxidante de redução do radical DPPH de 84,2 e 83,3%, respectivamente. Os fermentados dos resíduos de laranja com *A. flavipes* (76 a 89,7%), com *A. niger* (75 a 89,1%) e com *A. oryzae* (83 a 92%) apresentaram atividades antioxidantes semelhantes.

ABTS e DPPH são dois radicais livres comumente usados para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*. O método ABTS é rápido e pode ser usado em ampla faixa de valores de pH e em solventes orgânicos e aquosos. O método DPPH é amplamente utilizado para determinar a atividade antirradical/antioxidante de compostos fenólicos purificados e extratos naturais de plantas (ESPITIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2022). Alguns estudos relacionaram a atividade antioxidante de ABTS e DPPH aos compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) (TEIXEIRA *et al.*, 2022; XUE *et al.*, 2022; YEPES-BETANCUR *et al.*, 2021; PAPOUTSIS *et al.*, 2016; CASQUETTE *et al.*, 2015) e aminas biogênicas (KIM *et al.*, 2011; SANG *et al.*, 2007).

Todos os resíduos fermentados isolados e fermentados apresentaram atividade antioxidante utilizando o método FRAP. Os resíduos fermentados com diferentes espécies de *Aspergillus* sp. apresentaram as maiores atividades antioxidantes em relação aos resíduos isolados (Figura 12).

O método FRAP avalia a capacidade do composto de reduzir um pró-oxidante Fe^{3+} , a um composto menos reativo Fe^{2+} , portanto, a atividade antioxidante é medida pela quantidade de composto capaz de reduzir o ferro (Fe^{3+}) e é expressa como micro mol de ferro reduzido ($\mu\text{mol Fe reduzido}$) (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Barrales *et al.* (2018) investigaram os resíduos industriais obtidos após o processamento do suco e extração do óleo essencial de laranja quanto à capacidade antioxidante por FRAP. Os resíduos foram testados na forma de extratos etílicos (v/v água) a 99,5%, 75%, 50% e apresentaram, respectivamente, 98,6 mg TE/g, 203,3 mg TE/g e 219,6 mg TE/g. Já Dong *et al.* (2019) realizaram a mesma análise utilizando casca e polpa do limão siciliano (*Citrus limon* L. Burm. f.) obtidos manualmente e colhidos em diferentes épocas do ano, sendo que as partes dos frutos colhidos em fevereiro apresentaram a melhor atividade (18,60 $\mu\text{mol TE/g}$) em relação aos frutos colhidos em outros meses. O modo de obtenção das amostras e a análise dos dados obtidos por Barrales *et al.* (2018) e Dong *et al.* (2019) foram expressos de forma diferente da utilizada

no presente estudo. No entanto, os trabalhos descrevem a capacidade antioxidante dos extratos dos resíduos cítricos de redução dos íons ferro, corroborando com o observado para os resíduos de laranja isolados (bagaço: 66,2 $\mu\text{mol Fe}$ reduzido/kg, casca: 80,27 $\mu\text{mol Fe}$ reduzido/kg e frit: 99,35 $\mu\text{mol Fe}$ reduzido/kg).

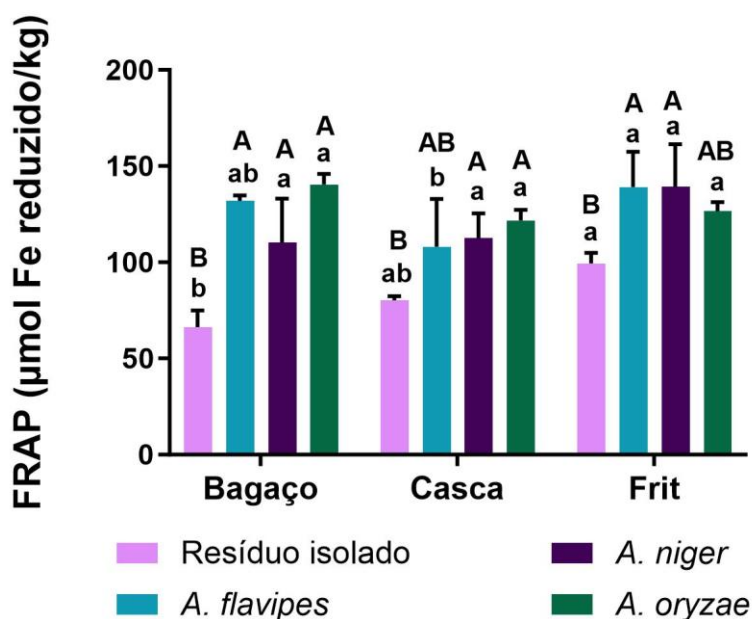


Figura 12. Atividade antioxidante, determinada pelo método FRAP, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de *Aspergillus* sp.

Ferro (Fe). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Xue *et al.* (2022) relatou 0,71 $\mu\text{mol Fe}$ reduzido/g para o extrato de casca de laranja isolado e 1,88 $\mu\text{mol Fe}$ reduzido/g para o produto de FES da casca de laranja com *A. niger*. No presente estudo, a casca de laranja fermentada com *A. niger* apresentou 112,6 $\mu\text{mol Fe}$ reduzido/kg - incremento na atividade antioxidante em relação ao resíduo isolado de 40%. Todos os resíduos de laranja fermentados apresentaram aumento de 34 a 99% na atividade antioxidante utilizando o método FRAP, evidenciando a importância da fermentação para a atividade antioxidante.

Todos os resíduos isolados e fermentados apresentaram atividade antioxidante utilizando o método do MDA (Figura 13). O método do MDA permite a detecção da atividade antioxidante pela capacidade do composto em inibir a oxidação dos ácidos

graxos, impedindo a consequente a formação, dentre outros compostos, do malonaldeído (MDA). Assim, quanto menor a produção de MDA, maior a capacidade antioxidante do composto testado (SUCUPIRA *et al.*, 2014).

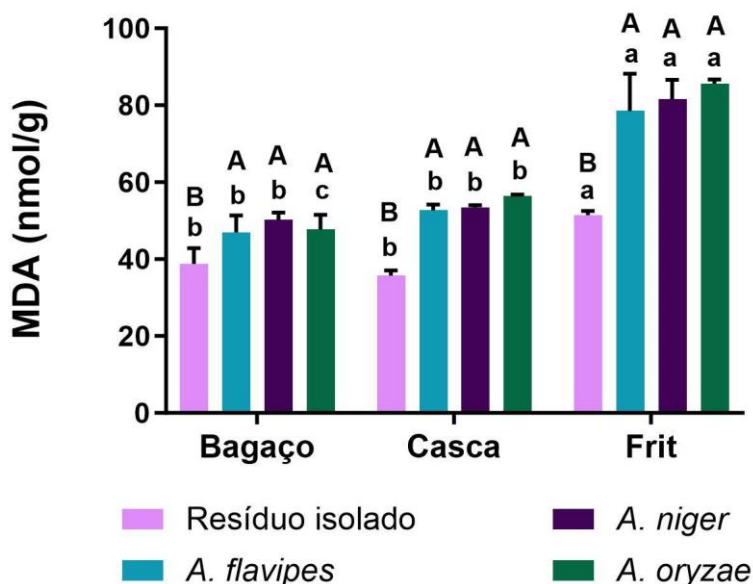


Figura 13. Atividade antioxidante, determinada pelo método MDA, dos resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de *Aspergillus* sp.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre resíduo isolado e o mesmo resíduo fermentado; e, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para o mesmo tipo de resíduo (isolado ou fermentado) entre as frações (bagaço, casca e frit), no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Neste caso, os resíduos de laranja isolados apresentaram as melhores atividades em relação aos fermentados. Dentre os isolados, o bagaço (37,93 nmol/g) e a casca (36,06 nmol/g) apresentaram atividades antioxidantes mais expressivas em relação ao frit (51,78 nmol/g). Camargo *et al.* (2022) realizaram a análise bromatológica dos resíduos de laranja do processamento do suco e o frit apresentou a maior concentração de conteúdo lipídico (6,6%) em relação ao bagaço (1,1%) e casca (5,4%), fator que pode estar relacionado com a maior formação de MDA comparado aos outros resíduos.

Omoba *et al.* (2015) testaram as cascas de laranja (*C. sinensis* Navel) maduras e verdes quanto à capacidade antioxidante pelo método MDA. O extrato da laranja madura apresentou (0,50 mg MDA/ml) maior capacidade antioxidante comparado ao extrato da laranja verde (0,63 mg MDA/ml). Apesar da diferença na análise e

interpretação dos dados, os estudos mostram que os resíduos de laranja apresentam capacidade antioxidante no teste de MDA, assim como observado no presente estudo para os resíduos de laranja.

O suco de uva combinado com 30% de batata doce, pesquisado por Basílio *et al.* (2022), apresentou 139,54 nmol/g de MDA, sendo que o frit fermentado com *A. oryzae* (84,97 nmol/g) no presente estudo apresentou formação de MDA 64% maior. O leite de soja fermentado com bactérias ácido lácticas apresentou formação de MDA de 300 nmol/ml, atividade menor do que a observada no leite de soja sem fermentação (450 nmol/ml) (TONOLO *et al.*, 2019), resultados contrários aos observados para os resíduos de laranja isolados que apresentaram menor formação de MDA em relação aos fermentados.

O óleo essencial extraído da casca do limão doce (*Citrus limetta*) foi usado em formulação anti-inflamatória testada *in vivo*, na qual contribuiu para a redução de peroxidação lipídica sofrida pelo tecido - o controle apresentou 0,19 μ mol MDA/ml e a amostra tratada com a formulação contendo 1% do óleo essencial apresentou 0,12 μ mol MDA/ml (MAURYA *et al.*, 2018). Esse resultado aponta o uso de compostos obtidos de *Citrus* sp. para composição de formulações dermatológicas e cosméticas, como já sugerido por Burnett *et al.* (2021).

A atividade antioxidante é uma das atividades biológicas mais valorizadas em cosméticos (CHERUBIM *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2018). Os resíduos de laranja isolados e fermentados apresentaram atividades antioxidantes em diferentes métodos e capacidade de reduzir diferentes radicais livres *in vitro*. Esses resultados podem estar atrelados as biomoléculas e compostos bioativos prospectados no presente estudo e apontam o amplo potencial que esses resíduos apresentam para serem utilizados como bioativos cosméticos ou conservantes de fórmulas de cremes, shampoos, óleos de banho (HEAT *et al.*, 2022; CHANDRA *et al.*, 2020; CHERUBIM *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2018) de fontes naturais e sustentáveis.

6.2. Teste de citotoxicidade – viabilidade celular

Para um ativo ser considerado para a aplicação cosmética, muitos testes e ensaios são indicados e exigidos por comitês de regulamentação como o *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS), ou em livre tradução, Comitê Científico de Segurança do Consumidor. O teste de citotoxicidade pelo método MTT é um dos ensaios *in vitro*

recomendado para avaliar a segurança do ativo ou produto, no entanto, um conjunto de métodos devem ser considerados para atestar plenamente a segurança de um ingrediente bioativo a ser incorporado a produtos cosméticos (ANVISA, 2012). O ensaio colorimétrico do cristal violeta (CV) quantifica o número de células aderentes, baseado na afinidade do corante com o DNA da célula, porém não oferece informações sobre a funcionalidade celular e foi utilizado como ensaio complementar ao MTT (CAPARICA *et al.*, 2020). No presente estudo o teste de citotoxicidade e viabilidade celular (Figuras 14 e 15) foram realizados como indicativo inicial para a aplicação dos resíduos de laranja isolados e fermentados em cosméticos.

No teste de citotoxicidade por MTT realizado com fibroblastos humanos (FP96), os resíduos de laranja isolados e fermentados nas concentrações de 6,25 e 12,5 mg/ml não foram tóxicos, exceto para o frit fermentado com *A. oryzae* (12,5 mg/ml) que inibiu o crescimento celular em 50%. Na concentração de 25 mg/ml, o frit sem fermentação reduziu a viabilidade celular em 50%, bem como, o bagaço, a casca e o frit fermentados com *A. niger*. A casca e o frit fermentados com *A. flavipes* reduziram a viabilidade celular para 60%, a casca fermentada com *A. oryzae* reduziu a viabilidade celular para 80%, enquanto o frit fermentado com *A. oryzae* reduziu a viabilidade celular para menos de 20%. Na concentração de 50 mg/ml, a maioria das amostras dos resíduos de laranja isolados e fermentados reduziram a viabilidade celular para 50% ou menos, exceto o bagaço isolado que manteve a viabilidade celular em 100% e a casca fermentada com *A. oryzae* que manteve a viabilidade celular acima dos 90% (Figura 14).

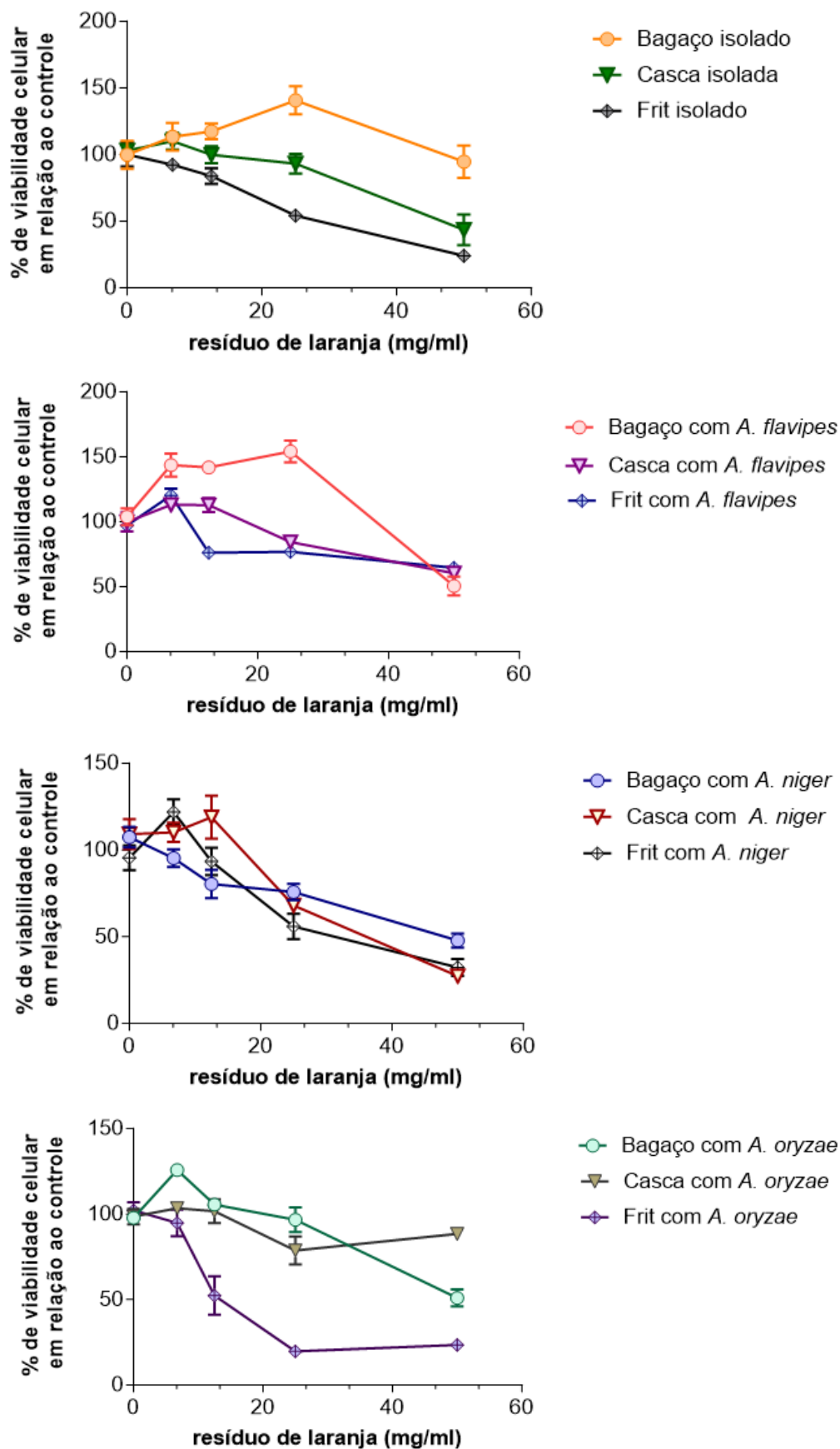


Figura 14. Citotoxicidade pelo teste MTT em fibroblastos humanos (FP96) tratados com os resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de *Aspergillus* sp.

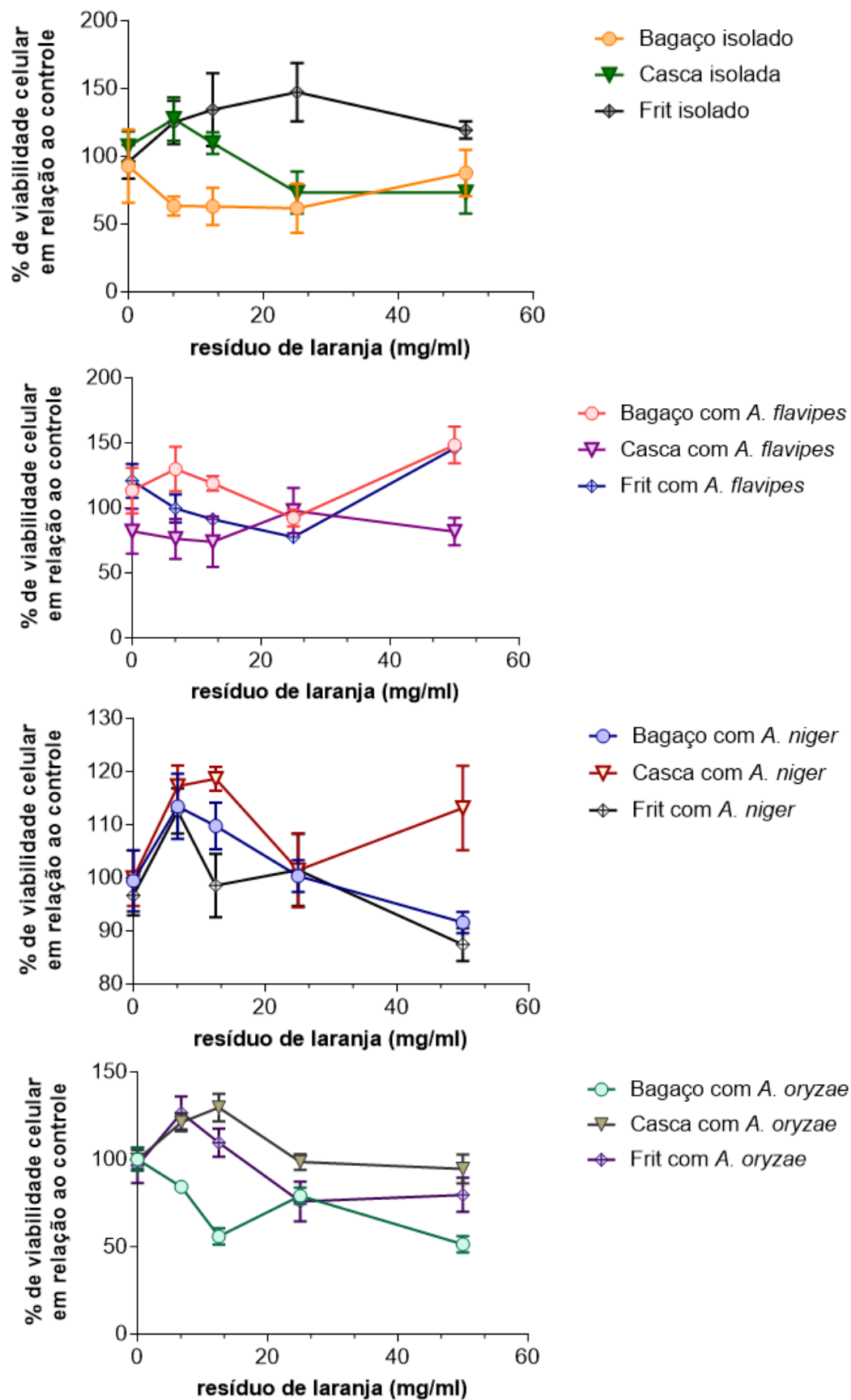


Figura 15. Viabilidade e adesão celular por cristal violeta (CV) de fibroblastos humanos (FP96) tratados com os resíduos de laranja isolados e fermentados por espécies de *Aspergillus* sp.

A citotoxicidade para células epiteliais IEC-18 do extrato aquoso de cascas de amendoim foi verificada por MTT. A viabilidade celular foi mantida até a concentração de 300 µg/ml de extrato. Já utilizando células humanas (PBMC) a viabilidade celular foi mantida até a concentração de 125 µg/ml (ROSSI *et al.*, 2020). Os tratamentos utilizaram menores concentrações dos extratos vegetais aplicadas as células quando comparado com as concentrações utilizadas no presente estudo.

Hosseini *et al.* (2016) aplicaram os extratos etílicos de casca e semente da laranja azeda (*Citrus aurantium*) nas concentrações de 12 µg/ml para a linhagem celular PC12 no teste MTT e observaram cerca de 60% de viabilidade celular, já nos testes com concentrações dos extratos de 200 µg/ml, obtiveram 80% de viabilidade celular. Ou seja, a viabilidade celular aumentou 20% com concentrações maiores do extrato vegetal adicionados ao meio de cultura (HOSSEINI *et al.*, 2016). Nas concentrações dos resíduos de laranja isolados e fermentados de 6,25 mg/ml a viabilidade celular se manteve próxima a 100% em relação ao controle.

As cascas do processamento industrial da laranja (*C. unshiu*) foram submetidas a diferentes processos de extração com etanol e os extratos foram aplicados ao teste de viabilidade celular da linhagem celular HaCat (queratinócitos humanos), visando a aplicação em cosméticos. Nas concentrações de 1 µg/ml e 10 µg/ml de extrato de casca obteve-se, em ambos os casos, 100% de viabilidade celular; enquanto com 100 µg/ml de extrato de casca obteve-se 80% de viabilidade celular (KIM *et al.*, 2008). Os compostos obtidos a partir de resíduos de *Citrus* sp. já foram considerados seguros para o uso como ativos em cosméticos (BURNETT *et al.*, 2021), no entanto, os testes citotóxicos são indispensáveis para prever concentrações e direcionar a melhor forma de aplicação.

O ensaio do MTT pode sofrer influência de compostos que modificam o metabolismo celular, portanto, o teste CV de aderência celular foi realizado para aumentar a confiabilidade dos resultados. No teste CV os resíduos de laranja isolados e fermentados em todas as concentrações não apresentaram inibição no crescimento celular abaixo de 50% (Figura 15), o que está em consonância com os resultados observados para o teste MTT, garantindo que as células estavam aderidas e viáveis.

As concentrações podem mudar de acordo com os compostos e linhagens celulares testadas. No presente trabalho, verificamos que os resíduos de laranja e os produtos de FES não foram citotóxicos para a linhagem de fibroblastos (FP96) nas

concentrações de 6,25 e 12,5 mg/ml e esses resultados preliminares podem ser considerados para as próximas análises celulares *in vitro* em estudos futuros.

6.3. Expressão do gene COL1A1 em fibroblastos

Os fibroblastos humanos (FP96) foram tratados com os resíduos de laranja isolados e fermentados na concentração de 12,5 mg/ml. Posteriormente, as células foram analisadas quanto a expressão do gene COL1A1 (Figura 16).

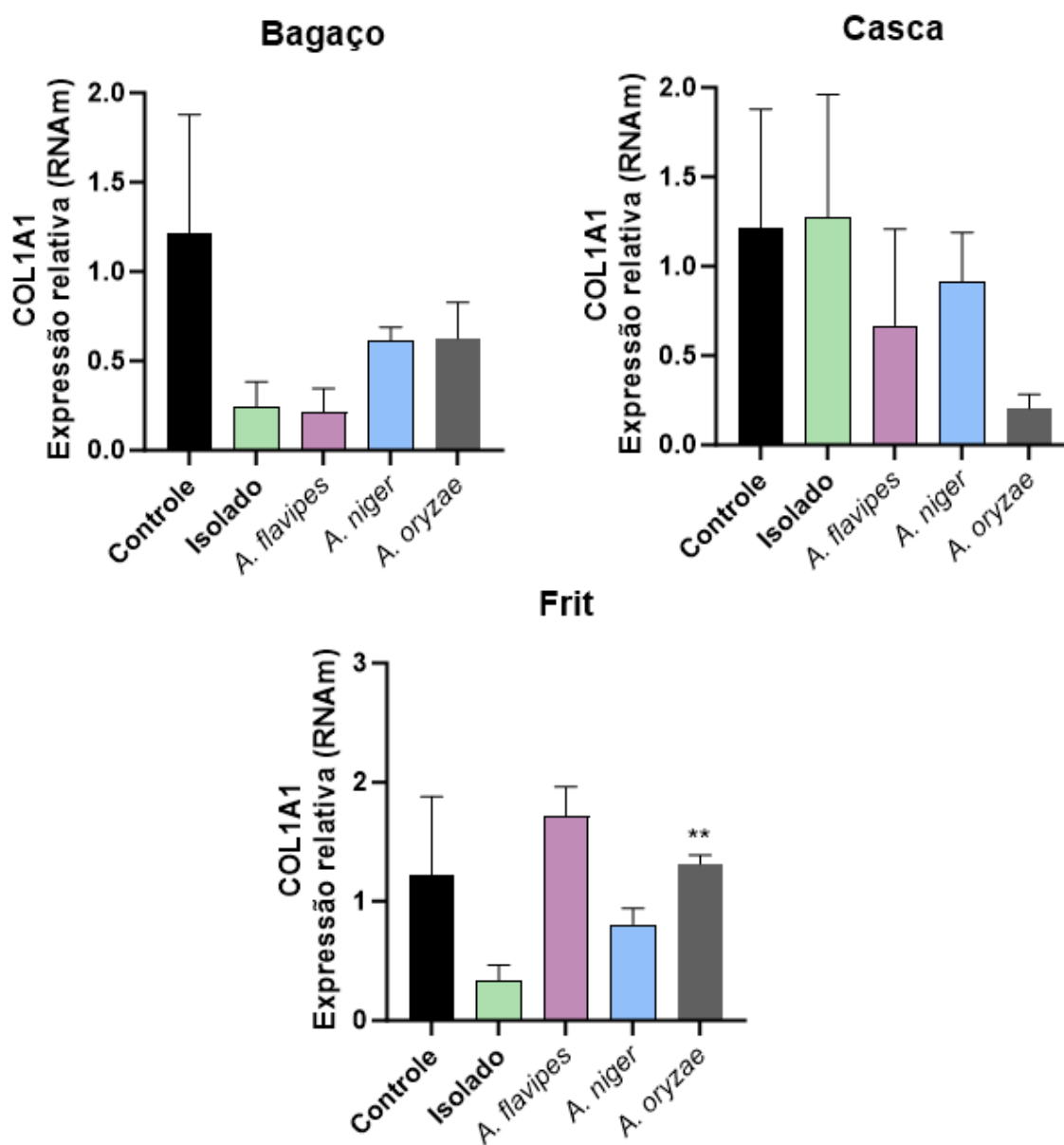


Figura 16. Níveis de expressão do gene COL1A1 em fibroblastos humanos tratados com resíduos de laranja isolados e fermentados por diferentes espécies de *Aspergillus* sp.

(*) Expressa diferença estística entre isolado e os demais tratamentos no teste Tukey ($p \leq 0,05$).

O gene COL1A1 é responsável pela síntese do colágeno tipo 1, a proteína fibrilar mais abundante em mamíferos (SUTKOWSKA *et al.*, 2021), principal constituinte da parte orgânica dos ossos, também encontrado na pele, dentes, tendões, ligamentos e fibras vasculares (TRONCOSO *et al.*, 2022). Na pele, o colágeno tipo I representa cerca de 85 a 90% do colágeno total, o restante é colágeno tipo III, representando de 10 a 15%. O colágeno tipo I fornece à derme sua integridade estrutural e tem impacto nas propriedades da pele, responsável pela resistência à tração e suas propriedades mecânicas, além de manter a firmeza e a elasticidade da pele (SUTKOWSKA *et al.*, 2021).

Os fibroblastos tratados com resíduos de laranja isolados e fermentados não apresentaram diferença estatística em relação ao tratamento controle na expressão do gene COL1A1. Entretanto, a expressão do gene COL1A1 foi duas vezes maior nos fibroblastos tratados com frit fermentado por *A. oryzae* do que nos tratados com frit isolado (Figura 16), indicando que a depender da concentração e mais estudos, os produtos fermentados podem ser interessantes para o propósito.

Os resultados corroboram com os descritos por Tomasello *et al.* (2022) que testaram o extrato combinado do suco das variedades Moro, Sanguinello e Tarocco de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) nas concentrações de 25 e 50 µg/ml e não observaram diferença de expressão do gene COL1A1 em relação ao grupo controle nos fibroblastos humanos (HFF-1). Já os fibroblastos humanos (OI) que foram testados quanto a expressão do gene COL1A1 após tratamento com extrato de folhas de alecrim (1 µg/ml) e erva cidreira (1 µg/ml) apresentaram expressão aumentada de aproximadamente 2 vezes em relação ao controle (SUTKOWSKA *et al.*, 2021).

O colágeno é usado com amplo espectro na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. No setor cosmético, produtos incorporam colágeno hidrolisado para reduzir o ressecamento e aumentar o preenchimento da pele e são sugeridos como suplementos alimentares como alternativa para repor colágeno e atender às necessidades do corpo (TRONCOSO *et al.*, 2022), sendo o interesse por produtos que prometem estimular o colágeno da pele crescente (BORUMAND; SIBILLA, 2015).

7. Conclusão e perspectivas

Os resíduos de laranja isolados e fermentados são fontes de aminoácidos aromáticos, proteínas solúveis, amins biogênicas e compostos fenólicos. Apresentaram atividade enzimática de protease e lipase. Pela primeira vez foi descrita atividade de SOD

para resíduos de laranja, obtidos industrialmente, isolados e fermentados com *Aspergillus* sp. Essas biomoléculas e compostos ativos podem ser considerados ingredientes para cosméticos e podem estar relacionados com as atividades antioxidantes que foram analisadas pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e MDA - a atividade biológica mais valorizada na área. Além disso, os resíduos não apresentaram citotoxicidade para a linhagem de fibroblastos humanos (FP96) nas concentrações de 6,25 mg/ml e 12,5 mg/ml pelos testes de MTT e CV. O gene COL1A1 foi expresso nos fibroblastos testados após serem tratados com os resíduos isolados e fermentados, no entanto, não apresentaram aumento de expressão em relação ao controle nas concentrações testadas. Os dados demonstraram o potencial do uso de resíduos de laranja em bioprocessos para a síntese de compostos bioativos para aplicação em cosméticos. O presente estudo realizou o *screening* de moléculas e compostos bioativos e pode ser usado como ponto de partida para trabalhos futuros avaliando outras aplicações para os bioprodutos obtidos, testes mais específicos para cosméticos, testes com outras linhagens celulares e até mesmo observar a expressão de outros genes que possam apontar quais vias celulares são ativadas.

Referências

- ABBAS, M.; SAEED, F.; ANJUM, F. M.; AFZAAL, M.; TUFAIL, T.; BASHIR, M. S.; ISHTIAQ, A.; HUSSAIN, S.; SULERIA, H. A. R. Natural polyphenols: An overview. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1689–1699, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>.
- ABIHPEC, A. B. da I. de H. P. P. e C. **Vendas de HPPC crescem 4,7% em 2020 e totalizam R\$ 122,4 bilhões**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://abihpec.org.br/vendas-de-hppc-crescem-47-em-2020-e-totalizam-r-1224-bilhoes/>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- ADAMSKA-SZEWCZYK, A.; ZGÓRKA, G. Plant polyphenols in cosmetics - a review. **European Journal of Medical Technologies**, [s. l.], v. 3, n. September, p. 1–10, 2019.
- ADDI, M.; ELBOUZIDI, A.; ABID, M.; TUNGMUNNITHUM, D.; ELAMRANI, A.; HANO, C. An Overview of Bioactive Flavonoids from Citrus Fruits. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–15, 2022.
- ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 1257–1269, 2021.
- ADU, S.; YAFETTO, L.; OFOSUHENE, A.; OFFEI.-AFFEDZIE, T.; ADU, S.; NTIBE, N.T. Biotechnological potential of agro-industrial wastes for protein enrichment by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. **Studies in Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 176–186, 2018.
- AHMED, H. A.; ABOUL-ENEIN, A. M.; ABOU-ELELLA, F.; SALEM, S. H.; ALY, H. F.; NASSRALLH, A.; SALAMA, Z. A. Nano-formulations of hesperidin and essential oil extracted from sweet orange peel: Chemical properties and biological activities. **Egyptian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 9, p. 5383–5395, 2021.
- ALANÓN, M. E.; SCHUMACHER, R.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; GÓMEZ-ALONSO, S.; PÉREZ-COELLO, M. S. Alternative amendment for vineyards from by-products of pyro-bituminous shale: Effect on wine amino acids and biogenic amines. **Food Research International**, [s. l.], v. 101, n. April, p. 239–248, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.008>.
- ALLWOOD, J. G.; WAKELING, L. T.; BEAN, D. C. Fermentation and the microbial community of Japanese koji and miso: A review. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 2194–2207, 2021.
- ALVAREZ, E.; VILLA, R.; NIETO, S.; DONAIRE, A.; GARCÍA-VERDUGO, E.; LUIS, S. V.; LOZANO, P. The Suitability of Lipases for the Synthesis of Bioactive Compounds with Cosmeceutical Applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 515–528, 2021.
- ANDERSEN, G.; MARCINEK, P.; SULZINGER, N.; SCHIEBERLE, P.; KRAUTWURST, D. Food sources and biomolecular targets of tyramine. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 107–115, 2019.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 15, p. 6475–6490, 2013.
- ANTICONA, M.; BLESÁ, J.; FRIGOLA, A.; ESTEVE, M. J. High biological value

compounds extraction from citruswaste with non-conventional methods. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2020.

ANVISA, A. N. de V. S. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. **Anvisa**, [s. l.], v. 2, p. 1–74, 2012.

ARAÚJO, F. F. de; FARIAS, D. de P.; NERI-NUMA, I. A.; PASTORE, G. M. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 338, n. March 2020, p. 127535, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>.

ATHANÁZIO-HELIODORO, J. C.; OKINO-DELGADO, C. H.; FERNANDES, C. J. da C.; ZANUTTO, M. R.; PRADO, D. Z. do; DA 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 and Biotechnology**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 565–573, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1476879>.

ATOLANI, O.; ADAMU, N.; OGUNTOYE, O. S.; ZUBAIR, M. F.; FABIYI, O. A.; OYEGOKE, R. A.; ADEYEMI, O. S.; AREH, E. T.; TARIGHA, D. E.; KAMBIZI, L.; OLATUNJI, G. A. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxicity, Anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial potentials of the *Citrus sinensis* seed oil for sustainable cosmeceutical production. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. e03399, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03399>.

AZEVEDO, A. R. G. de; AMIN, M.; HADZIMA-NYARKO, M.; SAAD AGWA, I.; ZEYAD, A. M.; TAYEH, B. A.; ADESINA, A. Possibilities for the application of agro-industrial wastes in cementitious materials: A brief review of the Brazilian perspective. **Cleaner Materials**, [s. l.], v. 3, n. December 2021, p. 100040, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clema.2021.100040>.

AZOUZI, S.; SANTUZ, H.; MORANDAT, S.; PEREIRA, C.; CÔTÉ, F.; HERMINE, O.; EL KIRAT, K.; COLIN, Y.; LE VAN KIM, C.; ETCHEBEST, C.; AMIREAULT, P. Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 112, n. 9, p. 1863–1873, 2017.

BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. Superoxide dismutase: An industrial perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 65–76, 2011.

BARBERIS, S.; ADARO, M.; ORIGONE, A.; BERSI, G.; GUZMÁN, F.; ILLANES, A. Peptide Synthesis Using Proteases as Catalyst. *In: BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF PLANT PROTEOLYTIC ENZYMES*. [S. l.: s. n.], p. 69–96, 2018.

BARBOSA, P. de P. M.; RUVIARO, A. R.; MACEDO, G. A. Comparison of different Brazilian citrus by-products as source of natural antioxidants. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1301–1309, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0383-4>.

BARCLAY, L. Replenishing the Aging Body's Antioxidant Defenses. [s. l.], n. January, 2007. Disponível em: http://www.lef.org/magazine/mag2007/jan2007_report_sod_03.htm.

BARRAGÁN-OCAÑA, A.; SILVA-BORJAS, P.; OLMOS-PEÑA, S.; POLANCO-

- OLGUÍN, M. Biotechnology and bioprocesses: Their contribution to sustainability. **Processes**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1–11, 2020.
- BARRALES, F. M.; SILVEIRA, P.; BARBOSA, P. de P. M.; RUVIARO, A. R.; PAULINO, B. N.; PASTORE, G. M.; MACEDO, G. A.; MARTINEZ, J. Recovery of phenolic compounds from citrus by-products using pressurized liquids — An application to orange peel. **Food and Bioprocess Processing**, [s. l.], v. 112, p. 9–21, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.08.006>.
- BARTKIENE, E.; BARTKEVICS, V.; RUSKO, J.; STARKUTE, V.; BENDORAITIENE, E.; ZADEIKE, D.; JUODEIKIENE, G. The effect of *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus sakei* on biogenic amines formation and free amino acid profile in different lupin during fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 74, p. 40–47, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.028>.
- BARTKIENE, E.; SCHLEINING, G.; JUODEIKIENE, G.; VIDMANTIENE, D.; KRUNGLEVICIUTE, V.; REKSTYTE, T.; BASINSKIENE, L.; STANKEVICIUS, M.; AKUNECA, I.; RAGAZINSKIENE, O.; MARUSKA, A. The influence of lactic acid fermentation on biogenic amines and volatile compounds formation in flaxseed and the effect of flaxseed sourdough on the quality of wheat bread. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 445–450, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.033>.
- BASHEER, C.; WONG, W.; MAKAHLEH, A.; TAMEEM, A. A.; SALHIN, A.; SAAD, B.; LEE, H. K. Hydrazone-based ligands for micro-solid phase extraction-high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in orange juice. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1218, n. 28, p. 4332–4339, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.073>.
- BASÍLIO, L. S. P.; BORGES, C. V.; MINATEL, I. O.; VARGAS, P. F.; TECCHIO, M. A.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. New beverage based on grapes and purple-fleshed sweet potatoes: Use of non-standard tubers. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 47, p. 101626, 2022.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BERK, Z. Introduction: history, production, trade, and utilization. **Citrus Fruit Processing**, [s. l.], n. 2009, p. 1–8, 2016.
- BERMEJO, A.; LLOSÁ, M. J.; CANO, A. Analysis of Bioactive Compounds in Seven Citrus Cultivars. **Food Science and Technology International**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 55–62, 2011.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.
- BORAH, D.; CHAUBEY, A.; SONOWAL, A.; GOGOI, B.; KUMAR, R. Microbial Biosurfactants and Their Potential Applications: An Overview. *In*: INAMUDDIN; AHAMED, Mohd Imran; PRASAD, Ram (org.). **Microbial Biosurfactants. Environmental and Microbial Biotechnology**. Singapura: Springer, 2021. p. 91–116.
- BORUMAND, M.; SIBILLA, S. Effects of a nutritional supplement containing collagen

peptides on skin elasticity, hydration and wrinkles. **Journal of Medical Nutrition and Nutraceuticals**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 47, 2015.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BURNETT, C. L.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.; LIEBLER, D. C.; MARKS, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; GILL, L. J.; HELDRETH, B. Safety Assessment of Citrus Peel-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, [s. l.], v. 40, n. 3_suppl, p. 77S-99S, 2021.

BYUN, B. Y.; MAH, J. H. Occurrence of Biogenic Amines in Miso, Japanese Traditional Fermented Soybean Paste. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 77, n. 12, p. 216–223, 2012.

CALADO, C.; MONTEIRO, S. M. S.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 354–359, 2002.

CAMARGO, D. A.; PEREIRA, M. S.; DOS SANTOS, A. G.; FLEURI, L. F. Isolated and fermented orange and grape wastes: Bromatological characterization and phytase, lipase and protease source. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 77, n. March, p. 102978, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.102978>.

CAPARICA, R.; JÚLIO, A.; BABY, A. R.; DE ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. In vitro cytotoxicity assessment of ferulic, caffeic and p-coumaric acids on human renal cancer cells. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2020.

CASQUETE, R.; CASTRO, S. M.; MARTÍN, A.; RUIZ-MOYANO, S.; SARAIVA, J. A.; CÓRDOBA, M. G.; TEIXEIRA, P. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 31, p. 37–44, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.005>.

CERRILLO, I.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; COLLADO-GONZÁLEZ, J.; ESCUDERO-LÓPEZ, B.; BERNÁ, G.; HERRERO-MARTÍN, G.; MARTÍN, F.; FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A. Effect of Fermentation and Subsequent Pasteurization Processes on Amino Acids Composition of Orange Juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 153–159, 2015.

CHANDRA, P.; ENESPA; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. [S. l.]: **BioMed Central**, 2020.v. 19. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 171, n. 2, p. 501–505, 1947. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0021->

9258(17)41059-3.

CHERUBIM, D. J. de L.; MARTINS, C. V. B.; FARIÑA, L. O.; DE LUCCA, R. A. da S. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 33–37, 2020.

CHO, U. M.; CHOI, D. H.; YOO, D. S.; PARK, S. J.; HWANG, H. S. Inhibitory Effect of Ficin Derived from Fig Latex on Inflammation and Melanin Production in Skin Cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 288–297, 2019.

CHOERA, T.; ZELANTE, T.; ROMANI, L.; KELLER, N. P. A multifaceted role of tryptophan metabolism and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in *Aspergillus fumigatus*-host interactions. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. JAN, p. 1–11, 2018.

CHOI, W. J.; KANG, S. M.; KOH, J. Effect of kiwifruit protease on the characteristics of human hair. **Fibers and Polymers**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1058–1064, 2012.

CHOUHAN, N.; VIG, H.; DESHMUKH, R. Cosmetics Market by Category (Skin and Sun Care Products, Hair Care Products, Deodorants & Fragrances, and Makeup & Color Cosmetics), Gender (Men, Women, and Unisex), and Distribution Channel (Hypermarkets/Supermarkets, Specialty Stores, Pharmacies. **Onlin**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/cosmetics-market>. Acesso em: 21 jun. 2022.

CITRUSBR, A. N. dos E. de S. C. **Safra de laranja 2021/22 é encerrada com produção total de 262,97 milhões de caixas**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://citrusbr.com/noticias/safra-de-laranja-2021-22-e-encerrada-com-producao-total-de-26297-milhoes-de-caixas/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

COMAS-BASTÉ, O.; SÁNCHEZ-PÉREZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; LATORRE-MORATALLA, M.; VIDAL-CAROU, M. D. C. Histamine intolerance: The current state of the art. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1–26, 2020.

CORRADINI, F. A. S.; ALVES, E. S.; KOPP, W.; RIBEIRO, M. P. A.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Kinetic study of soybean oil hydrolysis catalyzed by lipase from solid castor bean seeds. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 144, p. 115–122, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.02.008>.

COSENTINO, M.; RASINI, E.; COLOMBO, C.; MARINO, F.; BLANDINI, F.; FERRARI, M.; SAMUELE, A.; LECCHINI, S.; NAPPI, G.; FRIGO, G. Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: Evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 1233–1240, 2004.

COSMETIC INNOVATION. **Slow Beauty: consumo consciente do campo ao oceano**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://cosmeticinnovation.com.br/slow-beauty-consumo-consciente-do-campo-ao-oceano/>. Acesso em: 23 jun. 2022.

COSSAR, D. **Bioprocessing Techniques**. Second Edied. [S. l.]: Elsevier B.V., 2011. 2011.v. 1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00078-7>.

CUI, Y.; LI, J.; DENG, D.; LU, H.; TIAN, Z.; LIU, Z.; MA, X. Solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Trichoderma koningii* improves the quality of tea dregs for use

as feed additives. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 11 November, p. 1–20, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0260045>.

DANQUAH, A. O.; BENJAKUL, S.; SIMPSON, B. K. Biogenic Amines in Foods. **Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition**, [s. l.], p. 820–832, 2012.

DAUD, N. F. S.; SAID, F. M.; HO, J. M. Optimization of lovastatin in solid-state fermentation using oil palm frond. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 736, n. 2, 2020.

DE SOUZA, P. M.; DE ASSIS BITTENCOURT, M. L.; CAPRARA, C. C.; DE FREITAS, M.; DE ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

DEBATA, N. B.; SAHOO, H. S.; PAITAL, B. Artificial superoxide dismutase for cosmetic therapy and industrial use. **Academia Letters**, [s. l.], n. April, p. 1–5, 2021.

DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LINARES, D. M.; LADERO, V.; RUAS-MADIEDO, P.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M. C.; ALVAREZ, M. A. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

DINI, I.; LANERI, S. The new challenge of green cosmetics: Natural food ingredients for cosmetic formulations. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 13, 2021.

DOEUN, D.; DAVAATSEREN, M.; CHUNG, M. S. Biogenic amines in foods. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 1463–1474, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0239-3>.

DONG, X.; HU, Y.; LI, Y.; ZHOU, Z. The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 243, n. July 2018, p. 281–289, 2019.

DUARTE, J. G.; LEONE-IGNACIO, K.; DA SILVA, J. A. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. **Fuel**, [s. l.], v. 177, p. 123–129, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.02.079>.

DULF, F. V.; VODNAR, D. C.; DULF, E. H.; PINTEA, A. Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2017.

DULF, F. V.; VODNAR, D. C.; SOCACIU, C. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 209, p. 27–36, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.016>.

EISENBERG, T.; KNAUER, H.; SCHAUER, A.; BÜTTNER, S.; RUCKENSTUHL, C.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RING, J.; SCHROEDER, S.; MAGNES, C.; ANTONACCI, L.; FUSSI, H.; DESZCZ, L.; HARTL, R.; SCHRAML, E.; CRIOLLO,

A.; MEGALOU, E.; WEISKOPF, D.; LAUN, P.; HEEREN, G.; BREITENBACH, M.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; HERKER, E.; FAHRENKROG, B.; FRÖHLICH, K. U.; SINNER, F.; TAVERNARAKIS, N.; MINOIS, N.; KROEMER, G.; MADEO, F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1305–1314, 2009.

EL-AYOUTY, Y. M.; EL-SAID, A.; SALAMA, A. M. Purification and characterization of a keratinase from the feather-degrading cultures of *Aspergillus flavipes*. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 2313–2319, 2012.

EL-HAWARY, S. S.; MOAWAD, A. S.; BAHR, H. S.; ABDELMOHSEN, U. R.; MOHAMMED, R. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 37, p. 22058–22079, 2020.

EL-SAYED, A. S. A. Purification and characterization of a new L-methioninase from solid cultures of *Aspergillus flavipes*. **Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 130–140, 2011.

EL-SAYED, A. S.; SHINDIA, A. A.; ZAHER, Y. L-Amino acid oxidase from filamentous fungi: Screening and optimization. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 773–784, 2012.

EL-SHORA, H.; METWALLY, S.; ELZAWAWY, N. Production, optimization and purification of l-methioninase from *Aspergillus flavipes* aumc 1201 production, optimization and purification of l-methioninase from *Aspergillus flavipes* aumc 1201. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, [s. l.], v. 22, n. 33/34, p. 312–326, 2021.

ERLAND, L. A. E.; TURI, C. E.; SAXENA, P. K. **Serotonin in plants**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800050-2.00002-4>.

ESPITIA-HERNÁNDEZ, P.; RUELAS-CHACÓN, X.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; FLORES-NAVEDA, A.; SEPÚLVEDA-TORRE, L. Solid-State Fermentation of Sorghum by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*: Effects on Tannin Content, Phenolic Profile, and Antioxidant Activity. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 19, 2022.

FACT.MR. **Industrial Enzymes Market By Product Type (Carbohydrases, Proteases, Lipases) By Application (Technical, Feed Additives, Food Processing), By End Use - Global Forecast 2022-2032**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: [https://www.factmr.com/report/industrial-enzymes-market?utm_source=adwords&utm_medium=ppc&gclid=CjwKCAjwwo-WBhAMEiwAV4dybRzjOqnQeKqHn6ntnqOiMp6GSaqbWSYDv25zq0CjOIT76EUm20zhexoC-LUQAvD_BwE. .](https://www.factmr.com/report/industrial-enzymes-market?utm_source=adwords&utm_medium=ppc&gclid=CjwKCAjwwo-WBhAMEiwAV4dybRzjOqnQeKqHn6ntnqOiMp6GSaqbWSYDv25zq0CjOIT76EUm20zhexoC-LUQAvD_BwE.)

FAEG, F. da A. e P. de G. **Brasil se destaca como maior produtor mundial de laranja e exportador de suco da fruta**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: [https://sistemafaeg.com.br/faeg/noticias/citrus/brasil-se-destaca-como-maior-produtor-mundial-de-laranja-e-exportador-de-suco-da-fruta. .](https://sistemafaeg.com.br/faeg/noticias/citrus/brasil-se-destaca-como-maior-produtor-mundial-de-laranja-e-exportador-de-suco-da-fruta.)

FAO, F. and A. O. of the U. N. Citrus Fruit Statistical Compendium 2020. **Statistical bulletin**, [s. l.], p. 1–40, 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/citrus/en/>.

FAO, F. and A. O. of the U. N. **The State of Food and Agriculture: Moving Forward on Food Loss and Waste Reduction**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>. .

FARHA, S.; CHATTERJEE, E.; MANUEL, S. G. A.; REDDY, S. A.; KALE, R. D. Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 59–64, 2011.

FASIM, A.; MORE, V. S.; MORE, S. S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 69, p. 68–76, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019.

FONTAS, E.; MONTAUDIÉ, H.; PASSERON, T. Oral gliadin-protected superoxide dismutase in addition to phototherapy for treating non-segmental vitiligo: A 24-week prospective randomized placebo-controlled study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 1725–1729, 2021.

FRANCISCO, V. C. B.; OKINO-DELGADO, C. H.; ZANUTTO ELGUI, M. R.; FERNANDES, C. J. da 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 and Technology**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 1089–1099, 2019.

FUNDECITRUS, F. de D. da C. **Estimativa da safra de laranja 2022/23 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. Araraquara, SP: [s. n.], 2022.

FUTURE MARKET INSIGHTS. Natural cosmetics market. Report Future Market Insights, p.300, abril de 2023. Disponível em: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/natural-cosmetics-market>

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 1–16, 2011.

GALGANO, F.; CARUSO, M.; CONDELLI, N.; FAVATI, F. Focused review: Agmatine in fermented foods. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. JUN, p. 1–7, 2012.

GOLAKI, B. P.; AMINZADEH, S.; KARKHANE, A. A.; YAKHCHALI, B.; FARROKH, P.; KHALEGHINEJAD, S. H.; TEHRANI, A. A.; MEHRPOOYAN, S. Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous *Cohnella* sp. A01. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 109, p. 120–126, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2014.10.002>.

GOMES, C.; SILVA, A. C.; MARQUES, A. C.; LOBO, J. S.; AMARAL, M. H. Biotechnology applied to cosmetics and aesthetic medicines. **Cosmetics**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 1–14, 2020.

GOMEZ, H. A. G.; MARQUES, M. O. M.; BORGES, C. V.; MINATEL, I. O.; MONTEIRO, G. C.; RITSCHER, P. S.; ZANUS, M. C.; DIAMANTE, M. S.; KLUGE, R. A.; LIMA, G. P. P. Biogenic Amines and the Antioxidant Capacity of Juice and Wine from Brazilian Hybrid Grapevines. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 75, n.

2, p. 258–264, 2020.

GONÇALVES, S. G. D. Use of enzymes in cosmetics: proposed enzymatic peel procedure. **Cosmetically Active Journal**, [s. l.], v. 1, n. 29–35, p. 27–33, 2021.

GRUPO NEW SPACE. **Pacto Global das Nações Unidas Comunicação de Progresso 2021**. São Paulo: [s. n.], 2021.

GUAADAOU, A.; BENAICHA, S.; ELMAJDOUB, N.; BELLAOUI, M.; HAMAL, A. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 17–179, 2014.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 100, n. 21, p. 5249–5254, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.050>.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 42–49, 1994.

HANS, R. K.; AGRAWAL, N.; VERMA, K.; MISRA, R. B.; RAY, R. S.; FAROOQ, M. Assessment of the phototoxic potential of cosmetic products. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1653–1658, 2008.

HANO, S.; SHIBUYA, T.; IMOTO, N.; ITO, A.; IMANISHI, S.; ASO, H.; KANAYAMA, Y. Serotonin content in fresh and processed tomatoes and its accumulation during fruit development. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 214, p. 107–113, 2017.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HEATH, R. S.; RUSCOE, R. E.; TURNER, N. J. The beauty of biocatalysis: Sustainable synthesis of ingredients in cosmetics. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 335–388, 2022.

HENRIQUE, A. da S.; LOPES, G. C. A biodiversidade e a indústria de cosméticos : O uso de flavonoides contra o envelhecimento cutâneo. [s. l.], v. 29, n. 2, p. 58–63, 2019.

HOSSEINI, A.; SADEGHNIA, H. R.; RAJABIAN, A. Protective effects of peel and seed extracts of *Citrus aurantium* on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cell line. **Folia Neuropathologica**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 265–272, 2016.

HOU, Y.; HE, W.; HU, S.; WU, G. Composition of polyamines and amino acids in plant-source foods for human consumption. **Amino Acids**, [s. l.], v. 51, n. 8, p. 1153–1165, 2019.

HUANG, H.; LI, Y.; LIANG, J.; FINKELMAN, F. D. Molecular regulation of histamine synthesis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. JUN, p. 1–7, 2018.

HUCCETOGULLARI, D.; LUO, Z. W.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–29, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1090-4>.

- IPEA, I. de P. E. A. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/ods/>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- IRANSHAHI, M.; REZAAEE, R.; PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. **Life Sciences**, [s. l.], v. 137, p. 125–132, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.014>.
- IZQUIERDO, C.; GÓMEZ-TAMAYO, J. C.; NEBEL, J. C.; PARDO, L.; GONZALEZ, A. Identifying human diamine sensors for death related putrescine and cadaverine molecules. **PLoS Computational Biology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–13, 2018.
- JAIN, A.; GUPTA, M.; VERMA, K. K. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of biogenic amines in fruit juices and alcoholic beverages after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate and high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1422, p. 60–72, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.036>.
- JALAL, R. S.; ABULFARAJ, A. A. Exogenous application of agmatine improves water stress and salinity stress tolerance in turnip (*Brassica rapa* L.). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1–15, 2022.
- JBT FOOD TECH. **Extrator de suco cítrico**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.jbtc.com/foodtech/pt-br/products-and-solutions/products/juicers-finishers-and-extractors/citrus-juice-extractor/>. Acesso em: 26 jun. 2022.
- JEBLI, M. Ben; YOUSSEF, S. Ben. Combustible renewables and waste consumption, agriculture, CO2 emissions and economic growth in Brazil. **Carbon Management**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 309–321, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17583004.2019.1605482>.
- JODKO-PIÓRECKA, K.; LITWINIENKO, G. Antioxidant activity of dopamine and L-DOPA in lipid micelles and their cooperation with an analogue of α -tocopherol. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 83, p. 1–11, 2015.
- JONCKHEERE, D.; STEELE, J. A.; CLAES, B.; BUEKEN, B.; CLAES, L.; LAGRAIN, B.; ROEFFAERS, M. B. J.; DE VOS, D. E. Adsorption and Separation of Aromatic Amino Acids from Aqueous Solutions Using Metal-Organic Frameworks. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 9, n. 35, p. 30064–30073, 2017.
- JONNAKUTY, C.; GRAGNOLI, C. What do we know about serotonin?. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 217, n. 2, p. 301–306, 2008.
- KAROVICOVA, J.; KOHAJDOVA, Z. Biogenic amines in food. **Chemistry papers**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 70–79, 2005.
- KAZA, S.; YAO, L.; BHADA-TATA, P.; VAN WOERDEN, F. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. In: WORLD BANK PUBLICATIONS: WASHINGTON, 2018, [s. l.], . **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2018.
- KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 1793–1806, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.014>.
- KHORAIRI, A. N. S. A.; SOFIAN-SENG, N. S.; OTHAMAN, R.; ABDUL RAHMAN, H.; MOHD RAZALI, N. S.; LIM, S. J.; WAN MUSTAPHA, W. A. A Review on Agro-

industrial Waste as Cellulose and Nanocellulose Source and Their Potentials in Food Applications. **Food Reviews International**, [s. l.], v. 00, n. 00, p. 1–26, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1926478>.

KIM, S.-S.; LEE, J.-A.; KIM, J.-Y.; LEE, N. H.; HYUN, C.-G. Citrus Peel Wastes as funcional Materials for Cosmeceuticals. **Journal of Applied Biological Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 7–12, 2008.

KIM, B.; KIM, J. E.; LEE, S. M.; LEE, S. H.; LEE, J. W.; KIM, M. K.; LEE, K. J.; KIM, H.; LEE, J. D.; CHOI, K. Y. N-Nicotinoyl dopamine, a novel niacinamide derivative, retains high antioxidant activity and inhibits skin pigmentation. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 950–952, 2011.

KIM, B.; LEE, S. H.; CHOI, K. Y.; KIM, H. S. N-nicotinoyl tyramine, a novel niacinamide derivative, inhibits melanogenesis by suppressing MITF gene expression. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 764, p. 1–8, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.006>.

KIM, S. B.; LIU, Q.; AHN, J. H.; JO, Y. H.; TURK, A.; HONG, I. P.; HAN, S. M.; HWANG, B. Y.; LEE, M. K. Polyamine derivatives from the bee pollen of *Quercus mongolica* with tyrosinase inhibitory activity. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 81, n. August, p. 127–133, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.08.014>.

KIM, K. H.; YANG, M. C.; LEE, K. H.; LEE, I. K.; HA, S. K.; CHOI, P.; BAE, W.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Three new tyramine and two new phenolic constituents from *Limonia acidissima*. **Planta Medica**, [s. l.], v. 74, p. PB116, 2008.

KLEIN, M. O.; BATTAGELLO, D. S.; CARDOSO, A. R.; HAUSER, D. N.; BITTENCOURT, J. C.; CORREA, R. G. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>.

KUBLICKI, M.; KOSZELEWSKI, D.; BRODZKA, A.; OSTASZEWSKI, R. Wheat germ lipase: isolation, purification and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 184–200, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1939259>.

KUMAR, V.; AHLUWALIA, V.; SARAN, S.; KUMAR, J.; PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 323, n. October 2020, p. 124566, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>.

KUMAR, Sachin; KUMAR, B. V.; GULERIA, S.; PUROHIT, R.; KUMAR, Sanjay. Improving the catalytic efficiency and dimeric stability of Cu,Zn superoxide dismutase by combining structure-guided consensus approach with site-directed mutagenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1863, n. 1, p. 148505, 2022.

KUMAR, S.; SARAGADAM, T.; PUNEKAR, N. S. Novel route for agmatine catabolism in *Aspergillus niger* involves 4-Guanidinobutyrase. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 16, p. 5593–5603, 2015.

KUMITCH, H. M.; STONE, A.; NOSWORTHY, M. G.; NICKERSON, M. T.; HOUSE,

- J. D.; KORBER, D. R.; TANAKA, T. Effect of fermentation time on the nutritional properties of pea protein-enriched flour fermented by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. **Cereal Chemistry**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 104–113, 2020.
- KUPNIK, K.; PRIMOŽIČ, M.; VASIĆ, K.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. A comprehensive study of the antibacterial activity of bioactive juice and extracts from pomegranate (*Punica granatum* L.) peels and seeds. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 8, 2021.
- LANDETE, J. M.; ARENA, M. E.; PARDO, I.; MANCA DE NADRA, M. C.; FERRER, S. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 882–887, 2008.
- LEDESMA, A. Circular beauty: upcycled ingredients in cosmetic products. **The International Natural and Organic Cosmetics Association**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://www.natrue.org/circular-beauty-upcycled-ingredients-in-cosmetic-products/>.
- LEE, D. E.; LEE, S.; SEOK JANG, E.; WON SHIN, H.; SEOK MOON, B.; HWAN LEE, C. Metabolomic profiles of *Aspergillus oryzae* and *Bacillus amyloliquefaciens* during rice Koji fermentation. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 6, 2016.
- LEE, K-S.; LEE, W-S.; SUH, S-I.; KIM, S-P.; LEE, S-R.; RYOO, Y-W.; KIM, B-Y. Melatonin reduces ultraviolet-B induced cell damages and polyamine levels in human skin fibroblasts in culture. **Experimental and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 263–268, 2003.
- LEONARD, W.; ZHANG, P.; YING, D.; FANG, Z. Tyramine-derived hydroxycinnamic acid amides in plant foods: sources, synthesis, health effects and potential applications in food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 1608–1625, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1845603>.
- LI, Y.; TANG, A. G.; MU, S. HPLC-FLD determination of serum aromatic amino acids: Application in chronic kidney disease patients. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 412, n. 11–12, p. 1032–1035, 2011.
- LINARES, D. M.; DEL RIO, B.; REDRUELLO, B.; LADERO, V.; MARTIN, M. C.; FERNANDEZ, M.; RUAS-MADIEDO, P.; ALVAREZ, M. A. Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 197, p. 658–663, 2016.
- LIU, Q.; GAO, T.; LIU, W.; LIU, Yusong; ZHAO, Y.; LIU, Yuerong; LI, W.; DING, K.; MA, F.; LI, C. Functions of dopamine in plants: a review. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 15, n. 12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1827782>.
- LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. **3 Biotech**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.
- LODS, L. M.; DRES, C.; JOHNSON, C.; SCHOLZ, D. B.; BROOKS, G. J. The future of enzymes in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 85–94, 2000.
- LOPES, D. B.; FRAGA, L. P.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately?. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 608–613, 2011.

- LÓPEZ, J. Á. S.; LI, Q.; THOMPSON, I. P. Biorefinery of waste orange peel. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 63–69, 2010.
- LOURENÇO, C. B.; ATAIDE, J. A.; CEFALI, L. C.; NOVAES, L. C. d. L.; MORIEL, P.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B.; MAZZOLA, P. G. Evaluation of the enzymatic activity and stability of commercial bromelain incorporated in topical formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 535–540, 2016.
- LØVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 353–358, 1991.
- 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.
- MACHADO, S. A.; RÓS, P. C. M. da; CASTRO, H. F. de; GIORDANI, D. S. Hydrolysis of vegetable and microbial oils catalyzed by a solid preparation of castor bean lipase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 37, p. 102188, 2021.
- MADHAVAN, A.; SINDHU, R.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 245, p. 1304–1313, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.031>.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 715–721, 2002.
- MAHFOUDHI, A.; BENMABROUK, S.; FENDRI, A.; SAYARI, A. Fungal lipases as biocatalysts: A promising platform in several industrial biotechnology applications. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 119, n. 12, p. 3370–3392, 2022.
- MANFREDINI, P. G.; CAVANHI, V. A. F.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Bioactive peptides and proteases: characteristics, applications and the simultaneous production in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 360–377, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1849151>.
- MARTÍNEZ-TRUJILLO, A.; ARREGUÍN-RANGEL, L.; GARCÍA-RIVERO, M.; AGUILAR-OSORIO, G. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 202–209, 2011.
- MAURYA, A. K.; MOHANTY, S.; PAL, A.; CHANOTIYA, C. S.; BAWANKULE, D. U. The essential oil from *Citrus limetta* Risso peels alleviates skin inflammation: In-vitro and in-vivo study. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 212, p. 86–94, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.018>.
- MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. de J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 325–330, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.009>.
- MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: A review. **Journal of Biotech Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 58–77, 2017.

- MEINI, M. R.; CABEZUDO, I.; GALETTO, C. S.; ROMANINI, D. Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 42, n. May, p. 101168, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101168>.
- MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical Quality Index of Canned Tuna As Determined By High-Pressure Liquid Chromatography. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 155–158, 1977.
- MUÑOZ-ESPARZA, N. C.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; COMAS-BASTÉ, O.; TORO-FUNES, N.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, M. C. Polyamines in food. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 6, n. July, p. 1–11, 2019.
- NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food - existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 75, n. 7, 2010.
- NASCIMENTO, P. A.; ALVES, A. N.; DOS SANTOS, K. A.; VELOSO, C. M.; SANTOS, L. S.; DA COSTA ILHÉU FONTAN, R.; DOS SANTOS SAMPAIO, V.; BONOMO, R. C. F. Optimization of lipase extraction from pequi seed (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 45, n. 7, p. 1–8, 2021.
- NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**, [s. l.], v. 151, n. 2, p. 307–323, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ªed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 2014.
- NEGRI, S.; COMMISSO, M.; AVESANI, L.; GUZZO, F. The case of tryptamine and serotonin in plants: A mysterious precursor for an illustrious metabolite. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 72, n. 15, p. 5336–5355, 2021.
- NETO, F. J. D.; BORGES, C. V.; LIMA, G. P. P.; PIMENTEL JÚNIOR, A.; MONTEIRO, G. C.; FIGUEIRA, R.; VENTURINI FILHO, W. G.; MINATEL, I. O.; MOURA, M. F.; TECCHIO, M. A. Improvement of biogenic amines in grape juice from *Vitis labrusca* and hybrid grapes grown in different training systems. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 223–232, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14620316.2022.2117103>.
- NISHAD, J.; SAHA, S.; KAUR, C. Enzyme- and ultrasound-assisted extractions of polyphenols from *Citrus sinensis* (cv. Malta) peel: A comparative study. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 1–13, 2019.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 198, p. 119–124, 2016.
- OIKEH, E. I.; OVIASOGIE, F. E.; OMOREGIE, E. S. Quantitative phytochemical analysis and antimicrobial activities of fresh and dry ethanol extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet Orange) peels. **Clinical Phytoscience**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2020.
- OKINO-DELGADO, C. H.; DO PRADO, D. Z.; FACANALI, R.; MARQUES, M. M.

- O.; NASCIMENTO, A. S.; FERNANDES, C. J. da C.; ZAMBUZZI, W. F.; FLEURI, L. F. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1–17, 2017.
- OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 163, p. 103–107, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.090>.
- OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Orange and mango by-products: Agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description—A review. **Food Reviews International**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 1–14, 2016.
- OKINO-DELGADO, C. H.; PEREIRA, M. S.; DA SILVA, J. V. I.; KHARFAN, D.; DO PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Lipases obtained from orange wastes: Commercialization potential and biochemical properties of different varieties and fractions. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 35, n. 1, 2019.
- OKINO-DELGADO, C. H.; PEREIRA, M. S.; DO PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Evaluation of the influence of chemical and physical factors on mixtures of fungal and plant lipases. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 1–12, 2022.
- OKINO-DELGADO, 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**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 2927–2943, 2018.
- OKINO-DELGADO, Clarissa Hamaio; ZANUTTO-ELGUI, M. R.; DO PRADO, D. Z.; PEREIRA, M. S.; FLEURI, L. F. Enzymatic Bioremediation: Current Status, Challenges of Obtaining Process, and Applications. [s. l.], p. 79–101, 2019.
- OLUKOMAIYAA, O. O.; FERNANDO, W. C.; MEREDDYB, R.; LIC, X.; SULTANBAWAA, Y. Solid-state fermentation of canola meal with *Aspergillus sojae*, *Aspergillus ficuum* and their co-cultures : Effects on physicochemical , microbiological and functional properties a Centre for Nutrition and Food Sciences , Queensland Alliance for Agricultu. [s. l.], 2020.
- OMOBA, O. S.; OBAFAYE, R. O.; SALAWU, S. O.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. **Antioxidants**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 498–512, 2015.
- OMWANGO, E. O.; NJAGI, E. N. M.; ORINDA, G. O.; WANJAU, R. N. Nutrient Enrichment of Pineapple Waste using *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* by Solid State Fermentation. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 43, p. 6193–6196, 2013.
- OOI, C. K.; RASIT, N.; ABDULLAH, W.R.W. Optimization of Protease from *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation Utilizing Shrimp Shell Substrate. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 14809-14824, 2021.
- ORDÓÑEZ, J. L.; CALLEJÓN, R. Biogenic amines in non-fermented food. In: BIOGENIC AMINES IN FOOD: ANALYSIS, OCCURRENCE AND TOXICITY. 20. ed. London: Royal Society of Chemistry, 2020. p. 76–97.
- ORDÓÑEZ, J. L.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. D. C.; CALLEJÓN, R. M. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A

- review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 939, p. 10–25, 2016.
- OSHIMURA, E.; SAKAMOTO, K. Amino Acids, peptides and proteins. *In: COSMETIC SCIENCE AND TECHNOLOGY: THEORETICAL PRINCIPLES AND APPLICATIONS*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 285–300.
- OSORIO, L. L. D. R.; FLÓREZ-LÓPEZ, E.; GRANDE-TOVAR, C. D. The potential of selected agri-food loss and waste to contribute to a circular economy: Applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 2, 2021.
- OZCELIK, F.; TEMEL, M. C.; OZCELIK, İ. K.; KALE, E. The Role of Biogenic Amines in Nutrition Toxicology: Review. **International Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 21–29, 2020.
- OZDEMIR, S.; ACER, O.; KILINÇ, E. Bioaccumulation, tolerance, and removal of U(VI) and Th(IV) by a novel thermophilic *Bacillus cereus* ST14 isolated from hot spring mud samples in Afyonkarahisar, Turkey. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], n. Vi, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02645-4>.
- ÖZOGUL, Y.; ÖZOGUL, F. Biogenic amines formation toxicity, regulations in food. *In: BIOGENIC AMINES IN FOOD ANALYSIS, OCCURRENCE AND TOXICITY*. 20. ed. London: Royal Society of Chemistry, 2020. p. 1–13.
- PACKIANATHAN, N.; KANDASAMY, R. Skin Care with Herbal Exfoliants. **Functional Plant Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 5, p. 94–97, 2011.
- PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, [s. l.], v. 146, p. 161–172, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.035>.
- PAPAGEORGIOU, M.; LAMBROPOULOU, D.; MORRISON, C.; KŁODZIŃSKA, E.; NAMIEŚNIK, J.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 98, p. 128–142, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>.
- PAPOUTSIS, K.; PRISTIJONO, P.; GOLDING, J. B.; STATHOPOULOS, C. E.; SCARLETT, C. J.; BOWYER, M. C.; VUONG, Q. Van. Impact of different solvents on the recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from lemon (*Citrus limon* L.) pomace waste. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 971–977, 2016.
- PARTIYA, R.; FOTOUHI GHAZVINI, R.; FIFAEI, R.; GHASEMNEZHAD, M. Response of Different Citrus Genotypes to Continuous Flooding Conditions. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 253–263, 2018.
- PEREIRA, M. S.; OKINO-DELGADO, C. H.; VIEIRA, M. A. R.; SOARES, D. M.; CARVALHO, C. R. L.; MARQUES, M. O. M.; FLEURI, L. F. Compostos fenólicos: extração de resíduos de laranja e identificação. *In: FÓRUM INTERNACIONAL ONLINE DE EMPREENDEDORISMO E INOVAÇÃO NO AGRO*, 2020, [s. l.], . **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2020. p. 1–12. Disponível em: <https://proceedings.science/finovagro/forum-agro-2020/papers/compostos-fenolicos--extracao-de-residuos-de-laranja-e-identificacao>.

PEKAL, A., PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* 7, 1776–1782, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>

PILETZ, J. E.; ARICIOGLU, F.; CHENG, J. T.; FAIRBANKS, C. A.; GILAD, V. H.; HAENISCH, B.; HALARIS, A.; HONG, S.; LEE, J. E.; LI, J.; LIU, P.; MOLDERINGS, G. J.; RODRIGUES, A. L. S.; SATRIANO, J.; SEONG, G. J.; WILCOX, G.; WU, N.; GILAD, G. M. Agmatine: Clinical applications after 100 years in translation. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 18, n. 17–18, p. 880–893, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.017>.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; DO CARMO RUARO PERALBA, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, [s. l.], v. 490, p. 50–56, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2014.10.050>.

PRADO, D. Z. do; OKINO-DELGADO, C. H.; ZANUTTO-ELGUI, M. R.; SILVA, R. B. G. da; PEREIRA, M. S.; JAHN, L.; LUDWIG-MÜLLER, J.; SILVA, M. R. da; 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**, [s. l.], v. 19, n. August 2018, p. 101165, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101165>.

PRADO, D. Z. do; OLIVEIRA, S. L.; OKINO-DELGADO, C. H.; AUER, S.; LUDWIG-MÜLLER, J.; RIBEIRO DA SILVA, M.; JÚNIOR DA COSTA FERNANDES, C.; CARBONARI, C. A.; ZAMBUZZI, W. F.; FLEURI, L. F. *Aspergillus flavipes* as a novel biostimulant for rooting-enhancement of Eucalyptus. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 234, p. 681–689, 2019.

PRASANNALATHA, D.; HEMALATHA, K. P. J. Production of lovastatin by *Aspergillus flavipes* ncim 1209 using rice husk under solid state fermentation. **International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 12–23, 2015.

PRETI, R.; BERNACCHIA, R.; VINCI, G. Chemometric evaluation of biogenic amines in commercial fruit juices. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 242, n. 12, p. 2031–2039, 2016.

RAIESI, T.; GOLMOHAMMADI, M. Changes in nutrient concentrations and biochemical characteristics of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) infected by phytoplasma. **Journal of General Plant Pathology**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 486–493, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00944-0>.

RAHMAN, N. F. A.; SHAMSUDIN, R.; ISMAIL, A.; SHAH, N. N. A. K.; VARITH, J. Effects of drying methods on total phenolic contents and antioxidant capacity of the pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 50, n. 2017, p. 217–225, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.009>.

RAJPAL, C.; TOMAR, P. C. Cadaverine : A diamine presence & role in plants. **Plant Archives**, [s. l.], v. 20, p. 1754–1763, 2020.

RAZAK, D. L. A.; RASHID, N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.;

- LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 33–38, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.11.003>.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. In: **Free radical Biology & Medicine**. [S. l.: s. n.], 1999. v. 26, p. 1231–1237.
- RODRIGUES, F.; CÁDIZ-GURREA, M. D. L. L.; NUNES, M. A.; PINTO, D.; VINHA, A. F.; LINARES, I. B.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; CARRETERO, A. S. **Cosmetics**. [S. l.: s. n.], p. 394–427 Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. 2018.
- RODRIGUEZ, A.; KILDEGAARD, K. R.; LI, M.; BORODINA, I.; NIELSEN, J. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 31, p. 181–188, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2015.08.003>.
- RODRIGUEZ, A.; MARTÍNEZ, J. A.; FLORES, N.; ESCALANTE, A.; GOSSET, G.; BOLIVAR, F. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–15, 2014.
- ROMAN, M. C.; BETZ, J. M.; HILDRETH, J. Determination of synephrine in bitter orange raw materials, extracts, and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection: Single-laboratory validation. **Journal of AOAC International**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 68–81, 2007.
- ROSSETTO, M. R. M.; VIANELLO, F.; ROCHA, S. A. da; LIMA, G. P. P. Antioxidant substances and pesticide in parts of beet organic and conventional manure. **African Journal of Plant Science**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 245–253, 2009. Disponível em: [http://www.academicjournals.org/ajps/PDF/Pdf2009/Nov/Rossetto et al.pdf](http://www.academicjournals.org/ajps/PDF/Pdf2009/Nov/Rossetto%20et%20al.pdf).
- ROSSI, Y. E.; BOHL, L. P.; VANDEN BRABER, N. L.; BALLATORE, M. B.; ESCOBAR, F. M.; BODOIRA, R.; MAESTRI, D. M.; PORPORATTO, C.; CAVAGLIERI, L. R.; MONTENEGRO, M. A. Polyphenols of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin as bioprotectors of normal cells. Studies of cytotoxicity, cytoprotection and interaction with ROS. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 67, n. February, p. 103862, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103862>.
- RUVIARO, C. F.; BORGES, A.; FARINHA, M.; BERNARDO, L. M.; MORAIS, H. B.; LEIS, C. M.; DOMINGUES, C. F. Food losses and wastes in brazil: a systematic review. **Desenvolvimento Socioeconômico em Debate**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 78, 2020.
- SÁ, A. G. A.; MORENO, Y. M. F.; CARCIOFI, B. A. M. Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 97, n. January, p. 170–184, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>.
- SADH, P. K.; KUMAR, S.; CHAWLA, P.; DUHAN, J. S. **Fermentation: A boon for production of bioactive compounds by processing of food industries wastes (By-Products)**. [S. l.: s. n.] v. 23, 2018.
- SAEEDI, M.; ESLAMIFAR, M.; KHEZRI, K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 110, n.

November 2018, p. 582–593, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.006>.

SAGAR, N. A.; PAREEK, S.; SHARMA, S.; YAHIA, E. M.; LOBO, M. G. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 512–531, 2018.

SALVAGE, H. Experimental design and investigation of how cosmetic proteins affect bacteria found on the skin. [s. l.], n. March, 2022. Disponível em: <https://orca.cardiff.ac.uk/id/eprint/152391/>.

SANCHEZ, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; RAMOS, A.; DEMAÏN, A. L. Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. **Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 26–36, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2017.142>.

SANG, W. C.; SUNG, K. L.; EUN, O. K.; JI, H. O.; KYUNG, S. Y.; PARRIS, N.; HICKS, K. B.; MOREAU, R. A. Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 3920–3925, 2007.

SANGHVI, G.; PATEL, H.; VAISHNAV, D.; OZA, T.; DAVE, G.; KUNJADIA, P.; SHETH, N. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 87, p. 256–262, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.067>.

SANTOS, K. C.; CASSIMIRO, D. M. J.; AVELAR, M. H. M.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 49, p. 462–470, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.035>.

SANTOS, M. D. dos; BLATT, C. T. T. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miens de mata e cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, [s. l.], v. 21, n. 2, 1998.

SAVINO, S.; BULGARI, D.; MONTI, E.; GOBBI, E. Agro-industrial wastes: A substrate for multi-enzymes production by *Cryptosporidium parvum*. **Fermentation**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1–15, 2021.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.

SCHÜGERL, K.; HUBBUCH, J. Integrated bioprocesses. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 294–300, 2005.

SEBRAE. Cresça com os cosméticos orgânicos. Mercado e vendas | análise de tendência. Abril de 2023. Disponível em: <https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/cresca-com-os-cosmeticos-organicos>

ŠELO, G.; PLANINIĆ, M.; TIŠMA, M.; TOMAS, S.; KOCEVA KOMLENIĆ, D.; BUCIĆ-KOJIĆ, A. A comprehensive review on valorization of agro-food industrial

residues by solid-state fermentation. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2021.

SILVA, A. S.; REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; SÜNTAR, I.; SUREDA, A.; BELWAL, T.; LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; RASTRELLI, L.; FORBES-HERNANDEZ, T. Y.; BATTINO, M.; FILOSA, R.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Evaluation of the status quo of polyphenols analysis: Part I—phytochemistry, bioactivity, interactions, and industrial uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 3191–3218, 2020.

SIM, Y. C.; NAM, Y. S.; SHIN, Y. H.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I. S.; RHEE, J. S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as an enzymatic transdermal drug penetration enhancer. **Pharmazie**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 252–256, 2003.

SINGH, V. K. Enzimologia em Cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, [s. l.], v. 132, n. 4, p. 31–37, 2017.

SINGH, B.; SINGH, J. P.; KAUR, A.; SINGH, N. Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. **Food Research International**, [s. l.], v. 132, n. November 2019, p. 109114, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109114>.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Use of LED light for Brussels sprouts postharvest conservation. *In: METHODS IN ENZYMOLOGY*. [S. l.: s. n.], 1999. v. 299, p. 152–178.

SINHA, N.; PATRA, S. K.; SARKAR, T. S.; GHOSH, S. Secretome analysis identified extracellular superoxide dismutase and catalase of *Macrophomina phaseolina*. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 204, n. 1, p. 1–20, 2022.

SPRENGER, G. A. Aromatic Amino Acids. *In: MICROBIOLOGY MONOGRAPHS*. [S. l.: s. n.], 2006. p. 94–115.

STEPHENIE, S.; CHANG, Y. P.; GNANASEKARAN, A.; ESA, N. M.; GNANARAJ, C. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 68, n. March, p. 103917, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>.

SERBA, E. M.; TADZHIBOVA, P. Y.; RIMAREVA, L. V.; OVERCHENKO, M. B.; IGNATOVA, N. I.; VOLKOVA, G. S. Bioconversion of soy under the influence of *Aspergillus oryzae* strains producing hydrolytic enzymes. **Foods and Raw Materials**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 52–58, 2021.

SERVILLO, L.; CASTALDO, D.; GIOVANE, A.; CASALE, R.; D'ONOFRIO, N.; CAUTELA, D.; BALESTRIERI, M. L. Tyramine pathways in citrus plant defense: Glycoconjugates of tyramine and its N-methylated derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 892–899, 2017.

SERVILLO, L.; GIOVANE, A.; BALESTRIERI, M. L.; CASALE, R.; CAUTELA, D.; CASTALDO, D. Citrus genus plants contain N-methylated tryptamine derivatives and their 5-hydroxylated forms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 21, p. 5156–5162, 2013.

SERVILLO, L.; GIOVANE, A.; BALESTRIERI, M. L.; CAUTELA, D.; CASTALDO, D. N-methylated tryptamine derivatives in citrus genus plants: Identification of N, N, N-trimethyltryptamine in bergamot. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.],

v. 60, n. 37, p. 9512–9518, 2012.

SOARES, A. R.; MARCHIOSI, R.; DE CÁSSIA SIQUEIRA-SOARES, R.; DE LIMA, R. B.; DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE-FILHO, O. The role of L-DOPA in plants. **Plant Signaling and Behavior**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2014.

SPANO, G.; RUSSO, P.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; COTON, E.; COTON, M.; BARNAVON, L.; BACH, B.; RATRAY, F.; BUNTE, A.; MAGNI, C.; LADERO, V.; ALVAREZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; LOPEZ, P.; DE PALENCIA, P. F.; CORBI, A.; TRIP, H.; LOLKEMA, J. S. Biogenic amines in fermented foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 64, p. S95–S100, 2010.

STABRAUSKIENE, J.; MARKSA, M.; IVANAUSKAS, L.; VISKELIS, P.; VISKELIS, J.; BERNATONIENE, J. *Citrus paradisi* L. Fruit Waste: The Impact of Eco-Friendly Extraction Techniques on the Phytochemical and Antioxidant Potential. **Nutrients**, [s. l.], v. 15, n. 5, 2023.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B. Da; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Da. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014. Disponível em: <http://revistas.unopar.br/index.php/biologicas/article/view/442>.

SUN, M.; NIE, K.; WANG, F.; DENG, L. Optimization of the Lipase-Catalyzed Selective Amidation of Phenylglycinol. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. January, p. 1–10, 2020.

SUN, V. I.; OBERLEY, L.; U', V. Present address: Radiation Research Laboratory, 14 Medical Laboratories, The University of Iowa. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 497–500, 1988. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/34/3/497/5661714>.

SUNAR, K.; KUMAR, U.; DESHMUKH, S. K. **Recent Applications of Enzymes in Personal Care Products**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00012-5>.

SUPRAYOGI, W. P. S.; RATRIYANTO, A.; AKHIRINI, N.; HADI, R. F.; SETYONO, W.; IRAWAN, A. Changes in nutritional and antinutritional aspects of soybean meals by mechanical and solid-state fermentation treatments with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 17, n. November 2021, 2022.

SUTKOWSKA, J.; HUPERT, N.; GAWRON, K.; STRAWA, J. W.; TOMCZYK, M.; FORLINO, A.; GALICKA, A. The stimulating effect of rosmarinic acid and extracts from rosemary and lemon balm on collagen type i biosynthesis in osteogenesis imperfecta type i skin fibroblasts. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 7, 2021.

TAN, D. X.; HARDELAND, R.; BACK, K.; MANCHESTER, L. C.; ALATORRE-JIMENEZ, M. A.; REITER, R. J. On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], p. 27–40, 2016.

TEIXEIRA, B. F.; ARANHA, J. B.; VIEIRA, T. M. F. de S. Replacing synthetic antioxidants in food emulsions with microparticles from green acerola (*Malpighia emarginata*). **Future Foods**, [s. l.], v. 5, n. October 2021, p. 100130, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100130>.

- TREVISOL, T. C.; HENRIQUES, R. O.; SOUZA, A. J. A.; FURIGO, A. An overview of the use of proteolytic enzymes as exfoliating agents. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [s. l.], n. November, p. 1–8, 2021.
- TRONCOSO, F. D.; SÁNCHEZ, D. A.; FERREIRA, M. L. Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. **ChemistryOpen**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2022.
- TOMASELLO, B.; MALFA, G. A.; ACQUAVIVA, R.; LA MANTIA, A.; DI GIACOMO, C. Phytocomplex of a Standardized Extract from Red Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) against Photoaging. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 9, 2022.
- TONOLO, F.; MORETTO, L.; FOLDA, A.; SCALCON, V.; BINDOLI, A.; BELLAMIO, M.; FELLER, E.; RIGOBELLO, M. P. Antioxidant Properties of Fermented Soy during Shelf Life. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 287–292, 2019.
- TORRES-BARAJAS, L. R.; ALVAREZ-ZÚÑIGA, M. T.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; AGUILAR-OSORIO, G. Analysis of polysaccharide hydrolases secreted by *Aspergillus flavipes* FP-500 on corn cobs and wheat bran as complex carbon sources. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 390–400, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1700518>.
- TUCCI, P.; PORTA, G.; AGOSTINI, M.; DINSDALE, D.; IAVICOLI, I.; CAIN, K.; FINAZZI-AGRÓ, A.; MELINO, G.; WILLIS, A. Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 1–11, 2013.
- UTAMI, R. A.; ASYARIE, S.; RETNONINGRUM, D. S. Biochemical characterization of recombinant Cu-Zn SOD from *Citrus limon* fused to gliadin peptides. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 115–121, 2018.
- VALVERDE, A. P.; CAMARGO, A.; RODRIGUES, A. L. S. Agmatine as a novel candidate for rapid-onset antidepressant response. **World Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 981–996, 2021.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, L. T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.
- VÁZQUEZ, V. Á.; FLORES, M. M. A.; CASAS, L. F. H.; CASTILLO, N. A. M.; URIBE, A. R.; AGUADO, H. C. C. Biodiesel Production Catalyzed by Lipase Extract Powder of *Leonotis nepetifolia* (Christmas Candlestick) Seed. **Energies**, [s. l.], v. 16, n. 6, 2023.
- VECIANA-NOGUÉS, M. T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds volatile amines and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.2036-2041. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 45, p. 2036–2041, 1997.
- VEERABHADRAPPA, M. B.; SHIVAKUMAR, S. B.; DEVAPPA, S. Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. **Journal of**

Bioscience and Bioengineering, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 208–214, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.003>.

VIEIRA, S. M.; THEODORO, K. H.; GLÓRIA, M. B. A. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 895–903, 2007.

VINCI, G.; MADDALONI, L. Biogenic amines in alcohol-free beverages. **Beverages**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–19, 2020.

VISCIANO, P.; SCHIRONE, M. Update on Biogenic Amines in Fermented and Non-Fermented Beverages. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2022.

WANG, S.; TU, H.; WAN, J.; CHEN, W.; LIU, X.; LUO, J.; XU, J.; ZHANG, H. Spatio-temporal distribution and natural variation of metabolites in citrus fruits. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 199, p. 8–17, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.113>.

WHEATON, T. A.; STEWART, I. Biosynthesis of synephrine in Citrus. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 8, p. 85–92, 1969.

WILLIAMSON, G. The role of polyphenols in modern nutrition. **Nutrition Bulletin**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 226–235, 2017.

WINNIK, F. M. Elements of polymer science. *In*: PRINCIPLES OF POLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY IN COSMETICS AND PERSONAL CARE. New York: Marcel Dekker Inc, 1999. p. 1–43.

WOLF-MÁRQUEZ, V. E.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, M. A.; AGUILAR OSORIO, G.; PATIÑO, F.; ÁLVAREZ, M. S.; RODRÍGUEZ, A.; SANROMÁN, M. Á.; DEIVE, F. J. Scaling-up and ionic liquid-based extraction of pectinases from *Aspergillus flavipes* cultures. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 225, p. 326–335, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.067>.

WÓJCIK, W.; ŁUKASIEWICZ, M.; PUPPEL, K. Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 101, n. 7, p. 2634–2640, 2021.

XUE, P.; LIAO, W.; CHEN, Y.; XIE, J.; CHANG, X.; PENG, G.; HUANG, Q.; WANG, Y.; SUN, N.; YU, Q. Release characteristic and mechanism of bound polyphenols from insoluble dietary fiber of navel orange peel via mixed solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 161, n. September 2021, p. 113387, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113387>.

YAFETTO, L. Protein enrichment of cassava pulp by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. **Studies in Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 7–18, 2018.

YEPES-BETANCUR, D. P.; MÁRQUEZ-CARDOZO, C. J.; CADENA-CHAMORRO, E. M.; MARTINEZ-SALDARRIAGA, J.; TORRES-LEÓN, C.; ASCACIO-VALDES, A.; AGUILAR, C. N. Solid-state fermentation – assisted extraction of bioactive compounds from hass avocado seeds. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 126, p. 155–163, 2021.

YOUNUS, H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. **International journal of health sciences**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 88–93, 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5969776/>

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHITIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 7, 1998.

ZANUTTO-ELGUI, M. R.; VIEIRA, J. C. S.; PRADO, D. Z. do; BUZALAF, M. A. R.; PADILHA, P. de M.; ELGUI DE OLIVEIRA, D.; FLEURI, L. F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. November 2018, p. 823–831, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.119>.

ZHENG, M. M.; WANG, L.; HUANG, F. H.; GUO, P. M.; WEI, F.; DENG, Q. C.; ZHENG, C.; WAN, C. Y. Ultrasound irradiation promoted lipase-catalyzed synthesis of flavonoid esters with unsaturated fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 95, p. 82–88, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.05.028>.

ZHU, C.; LU, Q.; ZHOU, X.; LI, J.; YUE, J.; WANG, Z.; PAN, S. Metabolic variations of organic acids, amino acids, fatty acids and aroma compounds in the pulp of different pummelo varieties. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 130, 2020. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109445>.

ZOU, Z.; XI, W.; HU, Y.; NIE, C.; ZHOU, Z. Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 196, p. 885–896, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>.