

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/08/2023

At the author's request, the full text of this thesis / dissertation will not be available online until August 6, 2023

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

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

ANDRESSA GENEZINI DOS SANTOS

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

Botucatu - SP

Agosto - 2021

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

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

ANDRESSA GENEZINI DOS SANTOS
Zootecnista

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

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

Botucatu - SP
Agosto – 2021

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

Santos, Andressa Genezini dos.

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

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

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Coorientador: Margarida Maria Barros

Capes: 50403001

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

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

Biografia

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa fornecida durante o meu mestrado, processo n° 133266/2019-2.

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

Sumário

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

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

Lista de Figuras

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

Lista de Tabelas

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

Preâmbulo

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

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

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

Capítulo I: Revisão de Literatura

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Conclusões

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

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

7. Perspectivas

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

Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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