



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CAMPUS PROFESSORA CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL – PPGZT**

MARIA DE FÁTIMA COSTA DA SILVA

**BIOPROCESSO DE OBTENÇÃO DE PECTINASES POR *Trichoderma* spp.
UTILIZANDO CASCA DE LIMÃO E SUA APLICAÇÃO COMO ADITIVO
ENZIMÁTICO EM DIETA DE FRANGOS DE CORTE**

Bom Jesus - PI

2026

MARIA DE FÁTIMA COSTA DA SILVA

**BIOPROCESSO DE OBTENÇÃO DE PECTINASES POR *Trichoderma* spp.
UTILIZANDO CASCA DE LIMÃO E SUA APLICAÇÃO COMO ADITIVO
ENZIMÁTICO EM DIETA DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical (PPGZT) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Produção Animal nos Trópicos. Linha de pesquisa: Produção de Alimentos e Nutrição Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento

Bom Jesus - PI

2026

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Campus Professora Cinobelina Elvas
Setor de Processamento Técnico

S586b Silva, Maria de Fátima Costa da.

Bioprocesso de obtenção de pectinases *Trichoderma* spp. utilizando casca de limão e sua aplicação como aditivo enzimático em dieta de frangos de corte / Maria de Fátima Costa da Silva. -- 2026.
124 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical, Bom Jesus, Piauí, 2026.
“Orientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento”.

1. Zootecnia. 2. Frango de corte. 3. Pectinases. I. Nascimento, Thiago Pajeú. II. Título.

CDD 636

Bibliotecária: Nayra Fontinele Feijão – CRB3/1249

MARIA DE FÁTIMA COSTA DA SILVA

**BIOPROCESSO DE OBTENÇÃO DE PECTINASES POR *Trichoderma* spp.
UTILIZANDO CASCA DE LIMÃO E SUA APLICAÇÃO COMO ADITIVO
ENZIMÁTICO EM DIETA DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical (PPGZT) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Produção Animal nos Trópicos. Linha de pesquisa: Produção de Alimentos e Nutrição Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento

Aprovada em 23 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



THIAGO PAJEU NASCIMENTO

Data: 26/02/2026 11:36:06-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento (PPGZT/UFPI)
Orientador

Documento assinado digitalmente



CAMILA SOUZA PORTO

Data: 26/02/2026 11:15:54-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Camila Souza Porto (UFAL)
Examinadora externa

Documento assinado digitalmente



JULIO CEZAR DOS SANTOS NASCIMENTO

Data: 26/02/2026 11:20:38-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Júlio César dos Santos Nascimento (UFRPE)
Examinador externo

Documento assinado digitalmente



ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDAO COSTA

Data: 26/02/2026 11:29:02-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (UPE)
Examinador externo

Dedico, aos meus pais Maria do Amparo e Alvino que sempre me apoiaram mesmo que distante.

Dedico também a minha avó Maria das Dores (*in memoriam*), que sempre me incentivou, me apoiou a lutar pelos meus sonhos. Saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** e a **Nossa Senhora de Fátima**, por nunca ter me desamparado nos momentos difíceis, por nunca me deixar faltar a fé e a coragem e fazer com que eu chegasse tão longe nessa jornada, que não terminou, pois é só o começo da minha vida acadêmica.

Agradeço aos meus pais **Maria do Amparo** e **Alvino**, mesmo com a distância nunca deixaram de me ajudar, me dando força para conseguir alcançar meus objetivos. Obrigada pelas conversas todos os dias, pelos conselhos e por nunca me deixar desistir. Amo muito vocês hoje e para sempre. Vocês são tudo para mim.

Agradeço de coração ao meu amado namorado **Marcos**, que tem sido meu companheiro inseparável desde a graduação. Enfrentamos muitas coisas juntos, noites de estudo, desafios da vida acadêmica e da vida pessoal, e agora dividimos essa mesma jornada na pós-graduação. Obrigada pelo seu apoio incondicional, paciência (muita né kkkk) e os incentivos todos os dias, noites, madrugadas, horas, minutos e segundos, foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Obrigada por ser meu porto seguro, meu amor, meu parceiro de risadas e de conquistas. Eu te amo, Meu Amor!

Agradeço ao meu Orientador **Thiago Pajeú Nascimento** por ter me ajudado desde sempre, mesmo quando eu tinha dificuldades nas tarefas laboratoriais. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos. Prometo fazer jus a todos os ensinamentos.

Agradeço ao grupo de pesquisa **Bioagrofarm**, pela dedicação e auxílio durante toda a jornada.

Agradeço as minhas amigas Ana Kelly, Vanusa, Rayanne, Sheila, Isadora, Bea Abrantes e amigos Armando e Otavio pela amizade, conselhos risadas e apoio.

Obrigada a UFPI e ao Programa PPGZT pela oportunidade de cursar o Mestrado bem como agradecer a FAPEMA pelo apoio financeiro.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo produzir, caracterizar pectinases produzidas por *Trichoderma* spp. utilizando casca de limão como substrato e avaliar o efeito dessa enzima na dieta de frangos de corte sobre o desempenho zootécnico e parâmetros bioquímicos sanguíneos. Dentre os fungos estudados, foi selecionado o *Trichoderma orientale* UFPI 18 por apresentar melhor desempenho alcançando atividade de 1,20 U/mL e atividade específica de 83,75U/mg. Através de um planejamento 2^3 , determinaram-se como melhores condições de produção: 3,0g de casca de limão, 50% de umidade, e incubação a 35°C por 24h de fermentação, resultando em atividade pectinolítica de 1,45U/mL e atividade específica de 4,82U/mg. A pectinase purificada apresentou uma temperatura de 50°C, com acréscimo da atividade pectinolítica na presença de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Na^+ , e redução sob ação de Ba^+ . A purificação da enzima foi realizada por meio de planejamento (2^4) utilizando o sistema aquoso bifásico, no qual as melhores condições utilizando concentração de PEG (1.500g/mol) e concentração de 17% e uma concentração de fosfato de sódio de 18% e pH 8,0, resultou em coeficiente de partição ($K=0,82$), recuperação de 93,35% e fator de purificação 1,85 (fase sal). Os parâmetros cinéticos demonstraram que o extrato bruto é mais eficiente na conversão do substrato em produto em baixas concentrações, enquanto a enzima purificada apresenta maior potencial catalítico individual, quando o substrato está em concentrações mais elevadas. A avaliação da citotoxicidade indicou ausência de efeitos tóxicos frente a células normais e tumorais. Posteriormente, avaliou-se o efeito da enzima em 80 frangos de corte machos de crescimento lento da linhagem Pescoço Pelado onde foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (controle + 50 U/g de extrato). Os resultados demonstraram que não houve efeito significativo no desempenho zootécnico e nem alterações relevantes na maioria dos parâmetros bioquímicos, indicando segurança metabólica da suplementação nas condições testadas. Conclui-se que a produção de pectinases por fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, aliada ao uso de métodos de purificação, como os sistemas aquosos bifásicos, constitui uma alternativa biotecnológica eficiente e economicamente viável, apresentando elevado potencial de aplicação industrial, especialmente no desenvolvimento de aditivos enzimáticos para a nutrição de frangos de corte.

Palavras-chave: Enzimas exógenas; Fermentação em estado sólido; Nutrição animal; Sistemas aquosos bifásicos; Sustentabilidade biotecnológica; Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

This study aimed to produce and characterize pectinases produced by *Trichoderma* spp. using lemon peel as a substrate and to evaluate the effect of this enzyme in the diet of broiler chickens on zootechnical performance and blood biochemical parameters. Among the fungi studied, *Trichoderma orientale* UFPI 18 was selected for its superior performance, achieving an activity of 1,20 U/mL and a specific activity of 83,75 U/mg. Through a 2³ design, the best production conditions were determined to be: 3,0 g of lemon peel, 50% moisture, and incubation at 35°C for 24 hours of fermentation, resulting in a pectinolytic activity of 1,45 U/mL and a specific activity of 4,82 U/mg. The purified pectinase exhibited a temperature of 50°C, with increased pectinolytic activity in the presence of Mg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, and Na⁺, and reduced activity under the action of Ba⁺. Enzyme purification was performed using a design (2⁴) utilizing an aqueous biphasic system, in which the best conditions using a PEG concentration (1.500 g/mol) and a concentration of 17% and a sodium phosphate concentration of 18% and pH 8,0 resulted in a partition coefficient (K=0,82), a recovery of 93,35%, and a purification factor of 1,85 (salt phase). Kinetic parameters demonstrated that the crude extract is more efficient in converting the substrate to product at low concentrations, while the purified enzyme exhibits greater individual catalytic potential when the substrate is at higher concentrations. Cytotoxicity assessment indicated an absence of toxic effects against normal and tumor cells. Subsequently, the effect of the enzyme was evaluated in 80 slow-growing male broiler chickens of the Naked Neck strain, which were distributed in a completely randomized design with two treatments (control + 50U/g of extract). The results showed no significant effect on zootechnical performance nor relevant changes in most biochemical parameters, indicating the metabolic safety of the supplementation under the tested conditions. It is concluded that the production of pectinases by filamentous fungi of the genus *Trichoderma*, combined with the use of purification methods, such as aqueous two-phase systems, constitutes an efficient and economically viable biotechnological alternative, presenting high potential for industrial application, especially in the development of enzymatic additives for broiler nutrition.

Keywords: Exogenous enzymes; Solid-state fermentation; Animal nutrition; Aqueous two-phase systems; Biotechnological sustainability; Agro-industrial waste.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Enzimas pectinolíticas que degradam substâncias pécticas.....23

Tabela 2. Exemplos de espécies de fungos produtores de pectinases.....26

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^3 para produção das pectinases por fermentação em estado sólido.....46

Tabela 2. Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^4 para produção das pectinases por fermentação em estado sólido.....48

Tabela 3. Seleção dos *Trichoderma* produtores de pectinase utilizando a casca do limão como substrato.....53

Tabela 4. Planejamento fatorial 2^3 para a produção da pectinase com o fungo *Trichoderma orientale* utilizando casca de limão como substrato fermentado por três dias.....56

Tabela 5. Caracterização da produção de pectinases produzidas pelo fungo *Trichoderma orientale* UFPI 18 crescido em casca de limão nas condições de 3g de resíduo, 50% de umidade e 35°C.....62

Tabela 6. Purificação de pectinase de *Trichoderma orientale* UFPI18 por sistema de duas fases aquosas (polietilenoglicol/fosfato de sódio).....64

Tabela 7. Efeito de diferentes íons na atividade da pectinase presente no extrato bruto de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão e da enzima purificada por sistema de duas fases aquosas (SDFA), extraída da fase rica em sal.....85

Tabela 8. Parâmetros cinéticos da reação catalisada pela pectinase presente no extrato bruto e purificada pelo SDFA.....89

Tabela 9. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação catalisada pela pectinase presente no extrato bruto e purificada pelo SDFA.....91

CAPITULO 2

Tabela 1. Composição das rações comerciais utilizadas durante o período experimental.....	109
Tabela 2. Médias dos dados climáticos durante o período experimental (21 a 31 dias).....	114
Tabela 3. Desempenho de frangos de corte de 21 a 31 dias suplementado com a CP-TO.....	115

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Efeitos das variáveis independentes (temperatura, volume e umidade) sobre a produção de pectinases por <i>Trichoderma orientale</i> crescido em casca de limão fermentado por três dias.....	58
Figura 2. Gráfico de interação entre umidade e temperatura na produção de pectinase pelo <i>Trichoderma orientale</i> UFPI18.....	59
Figura 3. Gráfico cúbico das variáveis (temperatura, umidade e quantidade de resíduo), tendo como variável-resposta à produção de pectinase pelo <i>Trichoderma orientale</i> UFPI18.....	61
Figura 4. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição (K) da pectinase.....	66
Figura 5. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta à recuperação da pectinase na fase PEG.....	68
Figura 6. Gráfico de interação entre a C_{sal} e MM_{PEG} na recuperação da pectinase na fase PEG.....	69
Figura 7. Gráfico cúbico das variáveis (pH, concentração do PEG e Massa molar do PEG), tendo como variável resposta a recuperação da pectinase.....	70
Figura 8. Gráfico cúbico das variáveis (pH, concentração do sal e Massa molar do PEG), tendo como variável resposta a recuperação da pectinase.....	71

Figura 9. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta à recuperação da pectinase na fase sal.....	73
Figura 10. Gráfico de interação entre a pH e MM_{PEG} na recuperação da pectinase na fase sal.....	74
Figura 11. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o fator de purificação da pectinase na fase PEG (FP_{PEG}).....	76
Figura 12. Gráfico de interação entre a C_{Sal} e MM_{PEG} sobre o fator de purificação da pectinase na fase PEG (FP_{PEG}).....	77
Figura 13. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o fator de purificação da pectinase na fase sal (FP_{Sal}).....	79
Figura 14. Gráfico de interação entre a C_{Sal} e MM_{PEG} sobre o fator de purificação da pectinase na fase Sal (FP_{Sal}).....	80
Figura 15. Efeito do pH da pectinase produzidas por <i>Trichoderma orientale</i> (UFPI18) crescido em casca de limão.....	82
Figura 16. Efeito da temperatura da pectinase produzida por <i>Trichoderma orientale</i> crescido em casca de limão.....	84
Figura 17. Determinação da massa molecular da enzima pectinolítica utilizando SDS-PAGE.....	88
Figura 18. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929 expostos a diferentes concentrações de pectinase (3,90 a 500 μ g.mL ⁻¹) pelo ensaio de citotoxicidade.....	93
Figura 19. Avaliação da citotoxicidade da pectinase sobre a linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231).....	94

CAPÍTULO 2

Figura 1. Concentrações de glicose (A) e albumina (B) em extrato purificado obtido a partir de <i>Trichoderma orientale</i> cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.....	116
---	-----

Figura 2. Concentrações de triglicerídeos (A) e colesterol (B) em extrato obtido a partir de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.....117

Figura 3. Quantificação de proteínas em extrato obtido a partir de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.....119

Figura 4. Concentrações de fosfatase alcalina em extrato purificado obtido a partir de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.....120

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
	2.1 Objetivo Geral.....	18
	2.2 Objetivos específicos	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
	3.1 Valorização de resíduos agroindustriais na produção de enzimas.....	19
	3.2 Pectina: estrutura, ocorrência e importância em resíduos cítricos.....	21
	3.3 Pectinases: classificação, funções e aplicações biotecnológicas	22
	3.4 Microrganismos produtores de pectinases e o potencial de <i>Trichoderma</i> spp. 25	
	3.5 Processos fermentativos para produção de pectinases.....	27
	3.5.1 Fermentação Submersa (FS).....	28
	3.5.2 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	28
	3.6 Estratégias de extração, purificação e recuperação de pectinases por sistema de duas fases aquosas (SDFA)	29
	3.7 Aplicação das pectinases como aditivo enzimático na nutrição aves	31
	3.8 Efeitos das pectinases na fisiologia digestiva e desempenho de frangos de corte 33	
	REFERÊNCIAS	35
	CAPÍTULO 1: PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PECTINASES POR <i>Trichoderma</i> spp. UTILIZANDO CASCA DE LIMÃO COMO SUBSTRATO.....	42
	RESUMO:	42
	ABSTRACT:	43
1	INTRODUÇÃO	44
2	MATERIAIS E MÉTODOS	45
	2.1 Obtenção e tratamento do substrato para fermentação	45
	2.2 Microrganismos, meios de manutenção e esporulação.....	45
	2.3 Preparação do inóculo.....	45
	2.4 Seleção do fungo para produção de pectinases.....	45
	2.5 Planejamento fatorial para produção de pectinases por FES	46
	2.6 Determinação da atividade de pectinase	46
	2.7 Quantificação de proteínas.....	47
	2.8 Determinação do melhor tempo de produção de pectinase por planejamento fatorial 2 ³	47

2.9	Purificação da pectinase através do sistema de duas fases aquosas (SDFA) polietilenoglicol /Sal.....	47
2.10	Caracterização bioquímica da pectinase.....	49
2.10.1	Efeito do pH na atividade da pectinase	49
2.10.2	Efeito da temperatura na atividade da pectinase	49
2.10.3	Efeito de íons metálicos sobre a atividade pectinolítica.....	49
2.11	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	50
2.12	Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , $V_{máx}$ e k_{cat})	50
2.13	Parâmetros termodinâmicos da reação	51
2.14	Diferença de energia livre de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$).....	51
2.15	Ensaio de citotoxicidade	51
2.16	Análise estatística	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1	Seleção do fungo filamentososo para a produção de pectinase.....	52
3.2	Avaliação das variáveis de cultivo na produção de pectinase por <i>Trichoderma orientale</i> utilizando planejamento fatorial 2^3	55
3.3	Avaliação temporal da produção de pectinase.....	61
3.4	Purificação da enzima através do Sistema de Duas Fases Aquosas (Polietilenoglicol-fosfato de sódio)	63
3.4.1	Influência do coeficiente de partição (K) no processo de purificação da pectinase	65
3.4.2	Avaliação da recuperação enzimática (Y) sobre o processo de purificação da pectinase.....	67
3.4.3	Análise do fator de purificação (FP) como indicador da eficiência de purificação da pectinase.....	75
3.5	Caracterização bioquímica da pectinase	81
3.5.1	Efeito do pH na atividade da pectinase	82
3.5.2	Efeito da temperatura na atividade da pectinase	83
3.5.3	Efeito de íons sobre a atividade da pectinase	85
3.6	Perfil eletroforético da pectinase obtido por SDS-PAGE.....	87
3.7	Determinação da eficiência catalítica da pectinase (K_m , $V_{máx}$ e k_{cat}) e parâmetros termodinâmicos da reação	88
3.8	Análise termodinâmica da pectinase.....	91
3.9	Avaliação de citotoxicidade da pectinase em células normais e tumorais.....	92
4	CONCLUSÕES	96

REFERÊNCIAS	97
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA PECTINASE CÍTRICA DE <i>Trichoderma orientale</i> NA MODULAÇÃO DA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA E NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE FRANGOS DE CORTE.....	104
RESUMO	104
ABSTRACT	105
1 INTRODUÇÃO.....	106
2 MATERIAIS E MÉTODOS	107
2.1 Local do experimento e aprovação ética.....	107
2.2 Aditivo enzimático: Citrus-Pectinase de <i>Trichoderma orientale</i> (CP-TO)...	108
2.3 Animais, instalações e delineamento experimental	108
2.4 Ensaio de desempenho	110
2.5 Caracterização bioquímica do sangue.....	111
2.5.1 Determinação dos níveis de glicose	111
2.5.2 Quantificação de Albumina	112
2.5.3 Determinação do Colesterol e triglicerídeos	112
2.5.4 Quantificação de proteínas	112
2.6 Análises estatísticas	113
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
3.1 Dados ambientais durante o experimento	113
3.2 Desempenho.....	114
3.3 Perfil bioquímico do sangue	116
4 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS	122

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira se destaca como um dos setores mais relevantes do agronegócio nacional, exercendo papel fundamental na economia e na produção de alimentos (Paranhos *et al.*, 2020). Inicialmente, a criação de frangos no Brasil foi conduzida por pequenos produtores familiares, com foco em linhagens rústicas e resistentes, tradicionalmente associadas ao sistema caipira. A partir da década de 1970, o setor passou por um expressivo processo de modernização, impulsionado pela inserção de empresas de processamento, pela adoção de sistemas intensivos de produção, por avanços tecnológicos e pelo desenvolvimento genético de aves mais adaptadas às exigências produtivas (Zen *et al.*, 2014).

Atualmente, o Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial, resultado do contínuo investimento em melhoramento genético, nutrição animal e tecnologias aplicadas às instalações avícolas, o que permitiu elevados índices zootécnicos e melhores condições de bem-estar animal, minimizando os efeitos adversos das variações climáticas externas (Damasceno *et al.*, 2010). Entretanto, os custos relacionados à alimentação representam a maior parcela das despesas na produção animal, especialmente na avicultura, tornando essencial o uso de estratégias que promovam maior eficiência nutricional e redução de gastos.

Nesse contexto, os aditivos alimentares têm se destacado como ferramentas importantes, uma vez que podem melhorar o aproveitamento dos nutrientes e o desempenho zootécnico dos animais (Dalólio *et al.*, 2016). Dessa forma, torna-se necessário buscar alternativas que aumentem a eficiência alimentar, reduzam os custos de formulação e ampliem o uso de ingredientes alternativos nas dietas avícolas, sem comprometer o desempenho produtivo ou a qualidade do produto.

Nesse cenário, a biotecnologia aplicada à nutrição animal surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento sustentável da avicultura. Essa abordagem abrange a utilização de enzimas exógenas e bioconversão fúngica de resíduos agroindustriais conciliando produtividade, viabilidade econômica. Entre as principais biomoléculas utilizadas como aditivos, destacam-se as pectinases, também conhecidas como enzimas pectinolíticas (Chen *et al.*, 2024). Trata-se de um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar substâncias pécicas presentes na parede celular vegetal, favorecendo a liberação de nutrientes e melhorando a digestibilidade de dietas ricas em componentes fibrosos (Suhaimi *et al.*, 2016).

O gênero de fungo *Trichoderma* destaca-se como um dos principais produtores industriais de enzimas pectinolíticas de interesse biotecnológico e nutricional. Embora espécies como *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum* sejam amplamente exploradas, estudos recentes têm evidenciado o potencial de espécies ainda pouco investigadas, especialmente aquelas isoladas de ambientes naturais específicos (Xue *et al.*, 2025). Nesse contexto, áreas de ecótonos, caracterizadas como zonas de transição entre diferentes biomas, representam importantes *hotspots* de biodiversidade microbiana, que abrigam linhagens fúngicas com elevado potencial enzimático e características adaptativas únicas. Assim, a bioprospecção de espécies oriundas desses ambientes surge como uma estratégia promissora para a obtenção de enzimas com propriedades diferenciadas e maior aplicabilidade industrial (Fu *et al.*, 2023).

Adicionalmente, para viabilizar a utilização segura e eficiente dessas enzimas na nutrição animal, torna-se fundamental o desenvolvimento de métodos de recuperação e purificação que sejam economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis. Nesse sentido, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) destaca-se como uma alternativa, por permitir a extração e concentração enzimática em condições brandas, com menor consumo de solventes orgânicos, elevada eficiência de separação e potencial de escalonamento industrial (Alencar *et al.*, 2021).

Dessa forma, a produção e purificação de pectinases a partir de espécies não convencionais de *Trichoderma* spp., utilizando resíduos agroindustriais, pode representar uma abordagem estratégica para o desenvolvimento de novos aditivos enzimáticos aplicáveis à avicultura moderna. Uma vez purificadas, essas enzimas podem atuar como suplementos nutricionais para aves, contribuindo para a redução da viscosidade intestinal, aumento da liberação e absorção de nutrientes e melhoria do desempenho zootécnico, em dietas contendo ingredientes de origem vegetal ricos em polissacarídeos estruturais (Lauriane *et al.*, 2023).

Por fim, visando sua aplicação futura no mercado, torna-se essencial avaliar os efeitos do consumo dessas pectinases sobre os parâmetros zootécnicos e fisiológicos de frangos de corte, considerando indicadores como desempenho produtivo, digestibilidade, saúde intestinal e bem-estar animal (Sousa *et al.*, 2025). Assim, este trabalho contribui para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas sustentáveis, capazes de agregar valor à cadeia produtiva avícola e promover maior eficiência alimentar por meio do aproveitamento de resíduos agroindustriais e da aplicação de enzimas de interesse nutricional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver bioprocessos que possibilitem obter, purificar e caracterizar pectinases obtidas por *Trichoderma* spp. utilizando como substrato cascas de limão e a aplicação dessas enzimas como aditivo enzimático em dieta para frangos de corte.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar, entre as linhagens de *Trichoderma* spp. avaliadas, aquela com maior capacidade de produção de pectinase e realizar a produção enzimática por fermentação em estado sólido utilizando cascas de limão como substrato;
- Selecionar a melhor condição através de um planejamento fatorial 2^3 , onde serão analisadas as influências das variáveis: quantidade de resíduo, umidade e temperatura sobre a produção da enzima;
- Avaliar o perfil de produção da pectinase ao longo do tempo;
- Purificar a pectinase utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA) - polietilenoglicol/fosfato de sódio- avaliando as influências das variáveis independentes (massa molar e concentração do PEG, pH e concentração do sal);
- Caracterizar a pectinase bioquimicamente por meio da temperatura e pH ótimos, influência de íons sobre sua atividade enzimática.
- Determinar a massa molar da enzima através de SDS-PAGE;
- Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima (K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e K_{cat});
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da reação catalisada pela pectinase no extrato bruto e após a purificação pelo SDFA, incluindo energia livre de ativação ($\Delta G^\ddagger$), entalpia de ativação ($\Delta H^\ddagger$) e entropia de ativação ($\Delta S^\ddagger$), bem como calcular a diferença de energia livre de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$) entre as duas formas enzimáticas;
- Avaliar a citotoxicidade da pectinase frente a culturas celulares saudáveis e tumorais, visando verificar sua segurança e potencial aplicação biotecnológica;
- Aplicação da enzima pectinase como aditivo em dieta de frangos de corte;
- Avaliar os efeitos sobre o desempenho (conversão alimentar, ganho de peso e consumo de ração) de frangos de corte;
- Avaliar os parâmetros sanguíneos (glicose, colesterol, triglicerídeos, albumina, proteína e fosfatase alcalina) de frangos de corte.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Valorização de resíduos agroindustriais na produção de enzimas

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais tem ganhado crescente atenção nos últimos anos, impulsionado pela demanda por estratégias que minimizem desperdícios oriundos da produção e industrialização de alimentos. Esses resíduos são gerados em diferentes etapas do processamento agrícola e industrial, incluindo o processamento de carnes, a colheita de culturas e o consumo de alimentos, representando um dos principais desafios ambientais associados às cadeias produtivas modernas (Sadh *et al.*, 2018; Kaul *et al.*, 2024). Com o crescimento previsto da população global para aproximadamente 9,3 bilhões até 2050, o aumento no volume de resíduos tende a intensificar impactos econômicos, ambientais e de sustentabilidade (Fierascu *et al.*, 2019).

Do ponto de vista comercial e ambiental, esses subprodutos apresentam elevado potencial de valorização, uma vez que possuem rico conteúdo de matéria orgânica e nutrientes, podendo ser utilizados como matéria-prima de baixo custo em processos biotecnológicos. Essa abordagem permite a obtenção de produtos de valor agregado, como enzimas, biocombustíveis, vitaminas, aditivos, fertilizantes e antioxidantes, além de contribuir para a redução de resíduos e maior eficiência no uso de recursos naturais (Dilucia *et al.*, 2020).

Nesse contexto, resíduos lignocelulósicos como casca e bagaço de cana-de-açúcar, polpa cítrica, casca de arroz e farelo de soja destacam-se como fontes abundantes de carbono para a produção enzimática microbiana. Esses materiais apresentam elevadas concentrações de pectina, hemicelulose e celulose, atuando como substratos ideais para induzir a produção de enzimas como pectinases, xilanases e celulasas por fungos do gênero *Trichoderma* (Silva & Oliveira, 2022). Além disso, estratégias integradas que combinam pré-tratamentos e fermentação em estado sólido têm demonstrado aumentos significativos na produtividade enzimática (Costa *et al.*, 2023).

A valorização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas microbianas está diretamente associada aos princípios da economia circular e da bioeconomia sustentável, transformando materiais descartados em recursos estratégicos e reduzindo simultaneamente a poluição ambiental e os custos industriais. Entre esses resíduos, os subprodutos da indústria cítrica possuem destaque global, uma vez que a produção mundial gera aproximadamente 120

milhões de toneladas anuais de resíduos compostos principalmente por cascas, polpas e sementes, correspondendo a cerca de 50–60% da massa total dos frutos processados (Sajish *et al.*, 2025).

Entre os resíduos cítricos, a casca de limão (*Citrus limon*) destaca-se como substrato particularmente promissor para a produção microbiana de pectinases, devido ao seu alto teor de pectina (25% de matéria seca), composição nutricional favorável ao crescimento fúngico e capacidade de atuar como indutor específico da expressão de genes pectinolíticos (Garg *et al.*, 2016; Bierhalz, 2010). No Brasil, frutas cítricas tropicais e subtropicais vêm ganhando destaque econômico, com grande volume de produção e exportação de laranjas, tangerinas, limas e limões (Prevideli & Almeida, 2020).

Os resíduos provenientes do processamento industrial de frutas cítricas podem corresponder a mais de 50% do peso total do fruto, sendo compostos majoritariamente por cascas e polpas. Estima-se que apenas cerca de 45% da fruta seja efetivamente aproveitada na produção de sucos, resultando em resíduos como casca (27%), polpa (26%) e sementes (2%) (Leoporini *et al.*, 2021). Essa elevada geração de biomassa residual reforça a necessidade de estratégias sustentáveis para seu aproveitamento (Russo *et al.*, 2021; Zema *et al.*, 2018).

Além de pectina, esses subprodutos apresentam em sua composição sais minerais, fibras (pectina e celulose), proteínas, lipídios (ácidos linolênico, oleico, palmítico e esteárico), vitaminas (vitamina C e complexo vitamínico B), compostos fenólicos, açúcares (glicose, sacarose e frutose) e compostos voláteis, sendo tradicionalmente destinados à produção de ração animal ou à extração de óleos essenciais e pectina (Unicamp, 2017). Segundo dados do IBGE (2023), entre 2018 e 2023 o Brasil apresentou área colhida de 52.784 hectares e produção de 1.481.322 toneladas de limão, com maior concentração na região Sudeste.

A casca do limão apresenta diferentes camadas estruturais, como epicarpo, mesocarpo (albedo) e endocarpo. Dentre essas frações, o mesocarpo destaca-se por ser particularmente rico em polímeros como pectina (18-30%), celulose (12-20%) e lignina (3-10%), o que o torna especialmente relevante para aplicações industriais e biotecnológicas (Viana, 2010; Silva, 2015; Russo *et al.*, 2021). As fontes mais abundantes de pectina encontram-se justamente nas cascas de frutos cítricos, podendo atingir concentrações de até 30%, com destaque para o limão como uma das principais fontes (Morris *et al.*, 2002; Silva, 2013).

3.2 Pectina: estrutura, ocorrência e importância em resíduos cítricos

A pectina, também denominada substância péctica, consiste em macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular localizada principalmente na parede celular e na lamela média de vegetais superiores. Essas regiões são fundamentais para a adesão e integridade estrutural entre as células vegetais, que apresenta a organização estrutural da parede celular vegetal e da lamela média. As pectinas formam uma substância viscosa e são classificadas como polissacarídeos complexos e heterogêneos, podendo constituir entre 4 e 30% das cascas de frutas cítricas, sendo amplamente extraídas e utilizadas como estabilizantes e agentes estruturantes na indústria de alimentos (Infante, 2019).

A principal função da parede celular vegetal é evitar que a membrana plasmática das células se rompa, garantindo à célula elasticidade e resistência a tensões físicas e químicas, ou seja, suporte mecânico e defesa contra patógenos e insetos. Ela é dividida morfológicamente em três regiões distintas: parede secundária (S1, S2 e S3), composta por celulose, hemicelulose e lignina; parede primária, que é composta por microfibrilas de celulose (~30%), hemicelulose (~30%), pectina (~30%) e proteínas estruturais (~10%); e lamela média, rica em pectina (Raven *et al.*, 2001; Infante, 2019).

Devido à presença de grupos polares em sua estrutura, a pectina apresenta caráter hidrofílico e elevada capacidade de retenção de água, estando relacionada ao transporte de íons, bem como ao crescimento, tamanho e forma das células vegetais (Uenojo & Pastore, 2007). Dessa forma, sua degradação por enzimas pectinolíticas torna-se economicamente atrativa, sobretudo em processos industriais como extração e clarificação de sucos, manipulação da turbidez em bebidas, branqueamento de papel, tratamento de fibras têxteis e liberação de compostos bioativos com benefícios à saúde humana. A aplicação dessas enzimas contribui para o aumento da eficiência produtiva e para melhorias nas propriedades organolépticas e nutricionais dos produtos (Paiva *et al.*, 2009; Santi *et al.*, 2014; Costa, 2019).

As substâncias pécticas podem ser classificadas de acordo com modificações na cadeia principal. A protopectina corresponde à forma insolúvel em água presente nos tecidos vegetais, da qual se originam substâncias pécticas solúveis. O ácido péctico é constituído por ácidos poligalacturônicos cujos grupos carboxílicos não se encontram esterificados com grupos metila, enquanto o ácido pectínico apresenta quantidades variáveis de grupos metoxílicos, possuindo a propriedade de formar géis na presença de açúcares e cátions

divalentes. O termo pectina, por sua vez, é utilizado de forma genérica para misturas pécticas cujo principal componente é o ácido pectínico (Martins, 2006).

Estruturalmente, a cadeia principal da pectina, é composta por centenas de resíduos de ácido D-galacturônico (GalA) unidos por ligações α -1,4 apresentando cadeias laterais formadas principalmente por açúcares como ramnose, galactose, arabinose e xilose (Polizeli et al., 2013). A porção linear dessa cadeia, denominada homogalacturonana (HG), consiste em homopolímeros de GalA cujos grupos carboxílicos podem estar parcial ou totalmente esterificados com grupos metila, conferindo maior resistência à hidrólise das ligações glicosídicas (Pinheiro *et al.*, 2017).

Além da homogalacturonana, a pectina apresenta regiões ramificadas conhecidas como ramnogalacturonanas (RG), classificadas em tipo I e tipo II. A ramnogalacturonana I (RGI) é formada por uma cadeia principal composta por unidades alternadas de ácido galacturônico e ramnose, às quais se ligam cadeias laterais de arabinose e galactose, resultando em uma estrutura altamente complexa e heterogênea (Infante 2019). Já a ramnogalacturonana II (RGII) consiste em uma cadeia de homogalacturonana com cadeias laterais complexas formadas por diferentes monossacarídeos e ligações específicas, representando uma das porções estruturalmente mais elaboradas da molécula de pectina (Polizeli *et al.*, 2013).

Industrialmente, as pectinas são amplamente utilizadas como agentes gelificantes e espessantes, conferindo textura característica a produtos como geleias e doces. Dessa forma, são aplicadas nas indústrias processadoras de frutas, na produção de confeitos, na indústria láctea, de bebidas e em produtos de confeitaria fina (Revista Aditivos & Ingredientes, 2016). Assim, resíduos cítricos ricos em pectina, como a casca de limão, tornam-se substratos estratégicos para bioprocessos voltados à produção de pectinases microbianas, agregando valor a subprodutos agroindustriais e contribuindo para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis na biotecnologia enzimática.

3.3 Pectinases: classificação, funções e aplicações biotecnológicas

As enzimas que degradam a pectina são denominadas enzimas pectinolíticas e compreendem três grupos: as despolimerantes, as protopectinases e as desmetoxilante. Estas enzimas degradam a pectina em diversos dos seus sítios ativos (Jayani *et al.*, 2005; Li et al., 2015). As enzimas pectinolíticas são as responsáveis por hidrolisar tanto a pectina, como

outros polissacarídeos pécticos, em resíduos de ácido galacturônico. (Alkorta *et al.*, 1998; Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011; Suhaimi *et al.*, 2016).

As pectinases são classificadas pela sua forma de ação sobre as substâncias pécticas e são divididas em protopectinases, despolimerases e esterases. As protopectinases são responsáveis pela hidrólise da protopectina insolúvel, as despolimerases são as enzimas que catalisam a quebra das ligações entre as unidades de ácido galacturônico da cadeia principal e as esterases que atuam na remoção dos resíduos de metoxila, desesterificando a pectina e o ácido péctico (Nighojkar *et al.*, 2019; Tapre e Jain, 2014).

Existem diversas variações da enzima que, apesar da mesma função, possuem formas de ação diferentes, sendo classificadas de acordo com o ataque ao esqueleto galacturônico, em esterases, despolimerases e protopectinases (Tabela 1). Seu mecanismo também é classificado como endo e exo, por meio da ação em locais aleatórios da sequência ou a partir do final da cadeia, respectivamente (Uenojo e Pastore, 2007).

Tabela 1. Enzimas pectinolíticas que degradam substâncias pécticas.

TIPOS DE PECTINASES	EC	SUBSTRATO
Protopectinases tipo A	3.2.1.99	Protopectina
Protopectinases tipo B	3.2.1.99	Protopectina
Desesterificantes (Esterases)		
Pectina metil esterases	3.1.1.11	Pectina
Pectina acetil esterases	3.1.1.6	Pectina
Despolimerizantes (Hidrolases e Liases)		
HIDROLASES		
Endo-polimetilgalacturonase	3.2.1.15	Pectina
Exo-polimetilgalacturonase	3.2.1.67	Pectina
Endo-poligalacturonase	3.2.1.15	Ácido péctico
Exo-poligalacturonase (tipo I)	3.2.1.67	Ácido péctico
Exo-poligalacturonase (tipo II)	3.2.1.82	Ácido péctico
LIASES		
Pectato liase (ou poligalacturonato liase, PGL) – endo	4.2.2.2	Ácido péctico

Pectato liase (ou poligalacturonato liase, PGL) – exo	4.2.2.9	Ácido pécico
Pectina liase (ou polimetilgalacturonato liase, PMGL)	4.2.2.10	Pectina

EC – Estas enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a “Enzyme Commission” (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB.

Fonte: Poletto, 2015; Infante, 2019; Suhaimi *et al.*, 2021). Ilustração: Guimarães, N. C. A.

São produzidas a partir de processos de isolamentos de material de origem vegetal, animal e de processos de fermentação por microrganismos, pois é essencial utilizar fontes indutoras alternativas, de baixo custo, principalmente as que são consideradas resíduos agroindustriais de biomassas vegetais, como cascas de: laranja, limão, maracujá, caju e entre outros (Freitas *et al.*, 2021).

As pectinases representam aproximadamente 25% da produção mundial de enzimas utilizadas em processos industriais na área de alimentos (Yadav *et al.*, 2009). Estudos apontam que os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* são os principais produtores de enzimas pectinolíticas (Maller, 2008). Cerca de 50% das pectinases são produzidas a partir de fungos (Garzon *et al.*, 2021) e leveduras (Ezeh *et al.*, 2023), 35% de bactérias (Flores-Fernández *et al.*, 2022) e os 15% restantes são de origem vegetal ou animal (John *et al.*, 2020). Os microrganismos são fontes ideais e atrativas para a produção de enzimas industriais devido a sua grande diversidade e disponibilidade, rápido crescimento, tempo curto de cultivo e possibilidade de manipulação genética.

As pectinases são economicamente muito importantes, possui amplo aspecto de aplicações industriais, isso devido à alta concentração de material, isso porque possuem inúmeras aplicações na indústria têxtil, farmacêutica, de ração animal, detergente e papel, onde são mais utilizadas pectinases alcalinas produzidas por bactérias (Kuvvet *et al.*, 2019). Na extração de suco (Singh *et al.*, 2022), no processamento do café, na fermentação do café, cacau e chá, na preparação de geleias e compotas e no processo de amolecimento para a indústria de conservas (Kubra *et al.*, 2018). Na agricultura, são utilizadas para a purificação de vírus de plantas, extração de óleo, maceração, moagem e biolavagem de fibras de algodão (Pacheco-Quito *et al.*, 2020; Morin-Crini *et al.*, 2019).

Outra aplicação das enzimas pectinolíticas é na produção do bioetanol de segunda geração, em que são empregadas na extração dos açúcares fermentáveis (resíduos de ácido galactopiranosilurônico) a partir da pectina presente na parede celular vegetal (Latarullo *et al.*, 2016). Sendo assim, o emprego de pectinases no pré-tratamento de águas residuais pécicas provenientes de indústrias de processamento de alimentos vegetais facilita a remoção do material pécico e favorece a decomposição por tratamento de iodo ativado (Mahesh *et al.*, 2016).

As pectinases correspondem a um grupo de enzimas muito utilizado na nutrição animal, em que seu uso se faz com o principal intuito de reduzir os efeitos antinutritivos de leguminosas e a formação de gel na luz intestinal das aves, o que eleva a viscosidade do bolo alimentar, encontrado no farelo de soja, que é composto de 29,02% polissacarídeos não amiláceos (PNAs), sendo 4,21% de pentosanas e 6,16% de pectinas (Malathi; Devegowda, 2001).

Também são usadas como enzimas suplementares na alimentação animal para aumentar suas propriedades nutricionais (Tedesco *et al.*, 2021). E utilizadas para reduzir a viscosidade da ração, aumentando a liberação e absorção dos nutrientes, melhorando o desempenho do animal (Garg *et al.*, 2016).

3.4 Microrganismos produtores de pectinases e o potencial de *Trichoderma* spp.

As enzimas pectinolíticas são produzidas principalmente por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias, nematoides, insetos. Embora existam diferentes fontes de produção de pectinases, as fontes mais proeminentes, que oferecem as melhores taxas de produtividade, são de origem microbiana. Além disso, as pectinases microbianas mostram uma ampla especificidade de substrato, versatilidade e capacidade de atuar sobre uma variedade de substâncias pécicas, tornando-as biocatalisadores potenciais em vários processos industriais (John *et al.*, 2020).

Estima-se que as enzimas pectinolíticas produzidas por microrganismos representam 25% das vendas mundiais de enzimas alimentares (Sharma, 2012). Várias espécies de fungos são estudadas e classificadas como produtoras de pectinases. Entre elas as mais estudadas estão das espécies de *Aspergillus* e *Trichoderma* spp., (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos de espécies de fungos produtores de pectinases.

Espécies de fungo	Referência
<i>Aspergillus japonicus</i>	Guimarães (2023)
<i>Aspergillus niger</i>	Gomes <i>et al.</i> , 2015
<i>Trichoderma viride</i>	Yasin <i>et al.</i> , 2022
<i>Trichoderma reesei</i>	Singh <i>et al.</i> , 2019
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Guimarães (2023)
<i>Fusarium moniliforme</i>	Jayani <i>et al.</i> , 2005
<i>Fusarium oxysporum</i>	Jayani <i>et al.</i> , 2005

Fonte: Autoria própria.

Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos são os mais empregados na produção de pectinases em escala industrial, devido à elevada diversidade enzimática e à facilidade de cultivo. Além disso, as pectinases fúngicas apresentam atividade ótima em valores de pH próximos aos encontrados em sucos de frutas, geralmente na faixa de 3,0 a 5,5, o que favorece sua aplicação direta em processos agroindustriais (Ueda *et al.*, 1982). Outro aspecto relevante é que cerca de 90% das enzimas produzidas por fungos podem ser secretadas diretamente no meio de cultura, facilitando etapas posteriores de recuperação e purificação. A síntese dessas enzimas é influenciada por fatores como composição do meio, presença de indutores, pH e temperatura de cultivo (Blandino *et al.*, 2001).

A forma de nutrição dos microrganismos fúngicos é através da digestão extracelular, a qual consiste em secretar biomoléculas enzimáticas capazes de degradar o alimento, disponibilizando nutrientes no meio para que então sejam absorvidos (Ramos 2012; Tortora *et al.*, 2005). Esta capacidade de metabolização externa em conjunto com a facilidade de cultivo é o que torna os fungos filamentosos os mais interessantes para esta área biotecnológica (Guimaraes *et al.*, 2006).

Nesse contexto, destaca-se o gênero *Trichoderma*, amplamente reconhecido por seu rápido crescimento, elevada capacidade de adaptação e potencial enzimático. Espécies desse gênero são descritas como cosmopolitas e saprófitas, sendo encontradas em diferentes ambientes, desde regiões tropicais até áreas de clima frio e condições extremas, como solos antárticos (Macías-Rodríguez, 2020). O gênero *Trichoderma* é comumente observado em sua fase assexuada em colônias cultivadas em placas de Petri, apresentando morfologia típica e coloração característica, que mostra a morfologia microscópica e o crescimento em meio BDA.

Além de sua ampla distribuição, *Trichoderma* spp. é considerado um microrganismo de fácil isolamento e manutenção em laboratório, produzindo rapidamente grande quantidade de conídios verdes ou brancos a partir de estruturas conidiogênicas localizadas nas extremidades dos conidióforos (Siddiquee *et al.*, 2011). Estudos apontam que fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* estão entre os principais produtores de enzimas pectinolíticas descritos na literatura (Maller, 2008).

A produção e a atividade dessas enzimas, entretanto, dependem de diferentes variáveis físico-químicas do processo fermentativo, como temperatura, pH, composição do meio, atividade de água, concentração de inóculo e possíveis interações competitivas. Dessa forma, a otimização dessas condições representa um desafio essencial para garantir elevada produtividade e eficiência em bioprocessos industriais (Ribeiro *et al.*, 2019; Rigo *et al.*, 2021).

3.5 Processos fermentativos para produção de pectinases

A fermentação constitui uma das mais antigas formas de processamento de alimentos e bebidas, sendo utilizada desde a pré-história na produção de pão, cerveja, vinho, entre outros produtos tradicionais. Na China, estudos evidenciaram práticas fermentativas entre 2500 e 500 a.C., com destaque para o uso do “*koji*”, que consiste em uma massa umidificada de cereal cozido submetida ao crescimento de *Aspergillus oryzae*, promovendo a produção de um complexo enzimático com atividade diastática (Del Bianchi *et al.*, 2001).

Entretanto, apenas no século XIX, a partir dos estudos conduzidos por Louis Pasteur, foi demonstrado que a fermentação era um processo iniciado por organismos vivos. Posteriormente, com as descobertas de Büchner e outros pesquisadores, os mecanismos bioquímicos envolvidos nesses processos foram mais bem compreendidos (Cornish-Bowden,

1997; Tonolli, Franco e Silva, 2021). Com o avanço da biotecnologia ao longo dos anos, os processos fermentativos passaram a ser amplamente aplicados na indústria para obtenção de metabólitos e biomoléculas de interesse, como enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e biocombustíveis.

Os processos fermentativos podem ser conduzidos sob diferentes configurações, variando conforme o tipo de microrganismo, o substrato empregado, o objetivo do bioprocesso e o modo de operação do sistema, como batelada, fed-batch ou cultivo contínuo. No contexto da produção industrial de enzimas microbianas, destacam-se principalmente dois sistemas fermentativos amplamente utilizados: a fermentação submersa (FS), realizada em meio líquido, e a fermentação em estado sólido (FES), conduzida em substratos sólidos com baixa disponibilidade de água livre (Sant'Anna Jr., 2001; Musatti *et al.*, 2017). Neste trabalho, será enfatizada a fermentação em estado sólido, por sua adequação ao cultivo de fungos filamentosos e ao aproveitamento de resíduos agroindustriais, como a casca de limão.

3.5.1 Fermentação Submersa (FS)

A fermentação submersa (FS) consiste no cultivo de microrganismos em meio líquido contendo nutrientes dissolvidos, sob condições controladas de pH, temperatura e agitação constante. Este método apresenta vantagens relacionadas ao maior controle dos parâmetros de cultivo e à melhor homogeneização do sistema, favorecendo o contato entre enzima e substrato (Musatti *et al.*, 2017). Além disso, é frequentemente preferido em escala industrial devido à facilidade de instrumentação e monitoramento do processo (Sant'Anna Jr., 2001).

Um exemplo da aplicação da fermentação submersa na produção de enzimas pectinolíticas é descrito no estudo de Silva *et al.* (2021), no qual os autores utilizaram bagaço de malte, resíduo da indústria cervejeira, como fonte de carbono para o cultivo de duas espécies de macrofungos basidiomicetos (*Pleurotus djamor* e *Hypsizygus ulmarius*). Os resultados indicaram que variáveis como concentração do substrato, temperatura e agitação exerceram forte influência sobre o rendimento enzimático.

3.5.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

Para a produção de pectinases, destaca-se a fermentação em estado sólido (FES), caracterizada pelo crescimento microbiano em substratos sólidos com pouca ou nenhuma presença de água livre, mantendo apenas a umidade necessária para suprir as demandas

metabólicas do microrganismo. Esse tipo de fermentação apresenta menor geração de efluentes e fornece condições semelhantes ao habitat natural de fungos filamentosos, favorecendo maior adaptação e produtividade (Rodrigues *et al.*, 2020).

A FES apresenta diversas vantagens em relação à FS, dentre as quais podem ser destacadas (Santos 2007):

- Técnica mais simples;
- Possibilidade de utilização de resíduos abundantes e de baixo custo como matéria-prima;
- Condições de cultivo próximas ao ambiente natural do microrganismo;
- Maiores rendimentos do produto desejado;
- Tempo de fermentação mais curto.

Diversos microrganismos são capazes de crescer em substratos sólidos, porém os fungos filamentosos se destacam por apresentarem crescimento significativo mesmo sob baixa disponibilidade de água livre. Como exemplos, podem ser citados gêneros como *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (Raghavarao *et al.*, 2006).

3.6 Estratégias de extração, purificação e recuperação de pectinases por sistema de duas fases aquosas (SDFA)

A purificação de pectinases constitui uma etapa essencial para a obtenção de biocatalisadores com elevada especificidade, atividade e estabilidade, requisitos fundamentais para sua aplicação em processos industriais. Tradicionalmente, métodos como precipitação salina e diferentes modalidades cromatográficas têm sido amplamente empregados, permitindo a separação eficiente entre a enzima de interesse e proteínas contaminantes presentes no extrato bruto. No entanto, tais técnicas frequentemente demandam alto custo operacional e múltiplas etapas, o que limita sua aplicação em escala industrial (Erjavec *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) tem se destacado como uma alternativa promissora para a extração e pré-purificação de enzimas. Trata-se de um método de extração líquido-líquido introduzido por Albertsson na década de 1950, que vem sendo amplamente explorado como estratégia sustentável e escalonável para recuperação de biomoléculas (Monteiro-Filho 2010).

O SDFA apresenta vantagens relevantes, como baixo custo, fácil ampliação de escala e caráter ambientalmente favorável. Além disso, por ser constituído majoritariamente por água e possuir baixa tensão interfacial, oferece um ambiente biocompatível que preserva a estrutura e a estabilidade das enzimas durante o particionamento (Nascimento *et al.*, 2016). Esses sistemas podem ser formados pela combinação de dois polímeros ou por um polímero associado a um sal específico, os quais, acima de determinadas concentrações críticas, originam duas fases aquosas imiscíveis, permitindo que a biomolécula migre preferencialmente para uma das fases (Marini *et al.*, 2011; Asenjo & Andrews, 2012; Sales *et al.*, 2013).

O particionamento proteico no SDFA é influenciado por diferentes parâmetros físico-químicos, incluindo a massa molar do PEG, a concentração do polímero, a força iônica do sal, pH, temperatura e hidrofobicidade relativa das fases (Pericin *et al.*, 2009; Asenjo & Andrews, 2012). Entre as principais vantagens do método destacam-se a clarificação simultânea do extrato bruto, concentração e fracionamento em curto tempo de processamento, baixo consumo energético e elevada eficiência de recuperação enzimática (Yegin *et al.*, 2011; Raja *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2013).

Os sistemas PEG/sal são particularmente atrativos devido à elevada seletividade, baixa viscosidade e rápida separação de fases, sendo sais como fosfato, sulfato e citrato frequentemente utilizados em aplicações biotecnológicas (Xie *et al.*, 2011; Padilha *et al.*, 2011; Raja *et al.*, 2012). Após a recuperação, a caracterização bioquímica das pectinases purificadas é fundamental para determinar propriedades como peso molecular, pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica, parâmetros que definem suas aplicabilidades industriais. Estudos indicam que pectinases microbianas geralmente apresentam pesos moleculares entre 30 e 90 kDa e pH ótimo na faixa de 4,5 a 6,5, características que favorecem seu uso em setores como indústria alimentícia, têxtil, produção de bioenergia e alimentação animal (Kc *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2024).

Técnicas complementares, como eletroforese em gel (SDS-PAGE) e espectrometria, são frequentemente empregadas para avaliar a pureza e confirmar aspectos estruturais das enzimas obtidas, assegurando maior confiabilidade no processo de purificação (Melo *et al.*, 2021; Cermeño *et al.*, 2020). Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias eficientes de extração, purificação e caracterização de pectinases, especialmente utilizando o SDFA, representa um avanço relevante para a produção sustentável dessas enzimas em escala

industrial, ampliando seu potencial de aplicação como bioprodutos de alto valor agregado (Rigo *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2024).

3.7 Aplicação das pectinases como aditivo enzimático na nutrição aves

O uso de enzimas na alimentação animal é mais antigo do que frequentemente se imagina. Já em 1925, Hervey relatou benefícios no ganho de peso corporal de galinhas da linhagem Leghorn (Bedford, 2018). No mesmo período, Clickner e Follwell também observaram melhora no desempenho produtivo de galinhas poedeiras suplementadas com enzimas (Elwinger *et al.*, 2016). Nas últimas décadas, entretanto, a aplicação de enzimas exógenas tornou-se amplamente difundida, com produção e comercialização em larga escala, consolidando-se como estratégia nutricional relevante na avicultura moderna.

As enzimas exógenas atuam principalmente na degradação de polissacarídeos não amiláceos (PNAs), reduzindo a viscosidade intestinal e, conseqüentemente, aumentando a digestibilidade dos nutrientes. Além disso, contribuem para a diminuição da excreção de compostos como nitrogênio, zinco e cobre, reduzindo o impacto ambiental da produção avícola (Alagawany *et al.*, 2018). Entre as enzimas utilizadas na nutrição animal, destacam-se as carboidrases, responsáveis por catalisar a quebra de carboidratos complexos em açúcares simples. Esse grupo inclui enzimas que degradam o amido, bem como aquelas que atuam sobre os polissacarídeos não amiláceos presentes na parede celular vegetal (Campos *et al.*, 2017).

Os PNAs podem ocorrer nas formas solúvel e insolúvel e são considerados fatores antinutricionais dos grãos de cereais, pois podem comprometer a integridade intestinal, aumentar a incidência de enfermidades e elevar os custos de produção (Raza *et al.*, 2019). Esses carboidratos poliméricos apresentam estruturas variadas e, quando solúveis, tendem a formar soluções viscosas no trato gastrointestinal das aves. Como as aves não produzem enzimas endógenas capazes de hidrolisar eficientemente os PNAs, ocorre redução da eficiência alimentar, aumento do tempo de passagem da digesta e maior retenção de água, dificultando a ação de outras enzimas digestivas (Alagawany *et al.*, 2018; Delmaschio, 2018).

A classe das carboidrases é extensa, abrangendo enzimas como amilases, β -glucanases, celulases, pectinases e xilanases. As pectinases, em particular, promovem a degradação das pectinas presentes na parede celular vegetal, melhorando a digestibilidade e reduzindo a viscosidade intestinal. Já as xilanases atuam na degradação de xilanas e pentosanas dos

cereais, liberando açúcares fermentáveis e favorecendo o aproveitamento dos nutrientes. Além disso, a quebra parcial do arabinoxilano resulta na produção de xilo-oligossacarídeos, que podem ser metabolizados por bactérias benéficas, estimulando a microbiota intestinal e reduzindo microrganismos patogênicos (Sorio, 2012; Gomes *et al.*, 2019; Raza *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos utilizando pectinases em dietas à base de milho e farelo de soja indicou que a suplementação isolada dessa enzima apresenta efeito limitado sobre o desempenho zootécnico. Contudo, resultados mais consistentes têm sido observados quando a pectinase é empregada em combinação com outras enzimas, promovendo maior digestibilidade e melhorias em características de carcaça.

Igbasan *et al.* (1997), ao suplementarem dietas à base de ervilha com níveis crescentes de pectinase (0 a 125U/kg), observaram que ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e energia metabolizável aparente corrigida (AMEn) não diferiram significativamente em relação ao controle. Entretanto, a combinação de pectinase (50 U/kg) com α -galactosidase (6.250U/kg) apresentou tendência de melhora na taxa de crescimento ($P=0,06$), sugerindo possível sinergismo entre enzimas que degradam diferentes componentes da parede celular.

Saleh *et al.* (2005) avaliaram um complexo enzimático contendo celulase, hemicelulase e pectinase e verificaram melhora no ganho de peso e tendência de melhora na conversão alimentar, além de aumento na metabolizabilidade da matéria orgânica e da proteína bruta. Embora não tenha sido possível isolar o efeito individual da pectinase, os autores destacaram a eficácia do uso combinado de carboidrases em dietas à base de milho e soja.

Tahir *et al.* (2008) investigaram combinações de celulase, hemicelulase e pectinase em dietas com teor proteico reduzido e observaram que arranjos contendo hemicelulase e pectinase aumentaram significativamente a digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, enquanto a combinação celulase + pectinase não apresentou eficácia. Dalólio *et al.* (2016) avaliaram diferentes níveis de um complexo enzimático contendo fitase, protease, xilanase, β -glucanase, celulase, amilase e pectinase (4.000 U/g) em dietas milho-soja. Os autores concluíram que os parâmetros gerais de desempenho e qualidade da carne não foram significativamente afetados ($P > 0,05$), exceto para rendimento de peito e asas aos 42 dias de idade ($P < 0,05$).

Mais recentemente, Santos Neto *et al.* (2021) conduziram experimentos com frangos de corte Cobb 500 (1 a 42 dias), avaliando a inclusão “*on top*” de diferentes complexos enzimáticos e fontes de fitase. Foram observadas melhorias significativas no peso médio final, ganho de peso e conversão alimentar na fase pré-inicial, além de aumento no coeficiente de metabolizabilidade do extrato etéreo na fase de crescimento. Esses resultados reforçam o potencial da suplementação enzimática como estratégia nutricional eficiente, especialmente em fases iniciais de desenvolvimento.

3.8 Efeitos das pectinases na fisiologia digestiva e desempenho de frangos de corte

As aves não produzem naturalmente pectinases em seu sistema digestivo. Dessa forma, a atuação dessas enzimas na fisiologia digestiva ocorre apenas quando fornecidas de maneira exógena, por meio da suplementação na dieta. O principal objetivo consiste em promover a degradação das pectinas, polissacarídeos não amiláceos solúveis (PNAs), presentes em ingredientes vegetais como milho e farelo de soja, que, de outra forma, seriam parcialmente indigestíveis para esses animais (Vaz *et al.*, 2020). Os principais efeitos atribuídos às pectinases na fisiologia digestiva das aves incluem a degradação de fatores antinutricionais, a redução da viscosidade intestinal, a melhoria na absorção de nutrientes, a promoção da saúde intestinal e a liberação de nutrientes contidos na parede celular vegetal (Yu *et al.*, 2007).

Os efeitos antinutricionais dos PNAs estão relacionados às suas propriedades físico-químicas e às interações estabelecidas com outros componentes da dieta. Frações solúveis da fibra, como β -glucanas, pectinas e gomas, tendem a formar soluções coloidais que aumentam a viscosidade da digesta no intestino delgado (Hansen *et al.*, 1992).

O aumento da viscosidade da digesta contribui para a redução da taxa de passagem do conteúdo intestinal em animais não ruminantes, especialmente na porção inicial do trato digestório. Esse efeito pode estar associado à maior resistência ao peristaltismo intestinal, prejudicando a mistura do conteúdo luminal e inibindo, de modo geral, os processos digestivos. Por outro lado, a fibra insolúvel exerce efeito distinto, promovendo a diluição do conteúdo ileal, reduzindo o tempo de passagem e aumentando o volume fecal (Hansen *et al.*, 1992). Nesse contexto, as pectinases podem melhorar o valor nutricional de ingredientes ricos em PNAs solúveis, reduzindo a viscosidade gerada por determinados componentes dietéticos

e favorecendo a eficiência da digestão e da absorção de nutrientes (Olukosi *et al.*, 2015; Moftakharzadeh *et al.*, 2017).

Além da ação direta sobre a digestibilidade, as pectinases também contribuem para a modulação da microbiota intestinal, fator essencial para a manutenção da saúde digestiva das aves. A redução da viscosidade intestinal decorrente da degradação das pectinas cria um ambiente mais favorável à colonização por microrganismos benéficos, reduzindo a proliferação de patógenos e fortalecendo as defesas locais do trato gastrointestinal (Souza *et al.*, 2023). Essa melhoria no ambiente intestinal reflete-se em maior eficiência na absorção de nutrientes, aumento da resistência a doenças e, consequentemente, em ganhos produtivos e bem-estar animal.

Lu *et al.* (2013) destacaram que carboidrases, como as pectinases, são utilizadas com o intuito de neutralizar os efeitos negativos das fibras dietéticas, promovendo sua hidrólise e tornando os nutrientes mais disponíveis para absorção. De forma complementar, a suplementação enzimática em monogástricos, além de aumentar a digestibilidade e a disponibilidade nutricional, pode contribuir para a redução da excreção de nutrientes no ambiente, favorecendo sistemas de produção mais sustentáveis (Broch *et al.*, 2018).

Dessa maneira, a ação das pectinases na fisiologia digestiva das aves ocorre de forma indireta e depende da suplementação exógena, atuando na degradação de componentes dietéticos que seriam pouco aproveitados e que comprometem a eficiência digestiva desses animais.

REFERÊNCIAS

- ALAGAWANY, M.; ELNESR, S. S.; FARAG, M. R. The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 19, n. 3, p. 157–164, 2018.
- ALENCAR, V. N. S. *et al.* Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. v. 93, 2021.
- ALKORTA, I. *et al.* Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- BEDFORD, M. R. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. *British Poultry Science*, v. 59, n. 5, p. 486- 493, 2018.
- BIERHALZ, A. C. K. Confecção e Caracterização de Biofilmes Ativos à Base de Pectina BTM e de Pectina BTM/Alginato Reticulados com Cálcio. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2010.
- BORA H. *et al.* Óleos essenciais cítricos (OECs) e suas aplicações em alimentos: uma visão geral. Ceagesp - Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo. Limão. *Plants*, v. 9, p. 357, 2020. Disponível em <<https://ceagesp.gov.br/hortiescola/hortipedia/limão/>>. Acesso em novembro de 2025.
- CAMPOS, C. F. A. *et al.* Enzimas fúngicas em dietas com alimentos alternativos para frangos de crescimento lento. *Revista Desafios*, v. 04, n. 02, P.35-53, 2017.
- CORNISH-BOWDEN, Athel. **New beer in an old bottle: Edward Buchner and the growth of biochemical knowledge**. Valencia: Universitat de València, 1997.
- CHEN, H. *et al.* Solid-state fermentation of hyperactive pectinase by the novel strain *Aspergillus* sp. CM96 and its application potential. *Processes*, Basel, v. 12, n. 3, p. 615, 2024.
- CRUZ, F. G. G. **Formulação e fabricação de rações** / Frank George Guimarães Cruz; João Paulo Ferreira Rufino. – Manaus: EDUA, 2017.

DAILIN, D. J. *et al.* Current and Future Applications of Phytases in Poultry Industry: A Critical Review. Journal of Advances in VetBio, **Science and Techniques**. v. 3, n. 3, p. 65-64, 2018.

DAMASCENO, F. A. *et al.* Concepções arquitetônicas das instalações utilizadas para a produção avícola visando o conforto térmico em climas tropicais e subtropicais. **Pubvet**, v. 4, n. 42, 2010.

DALÓLIO, F. S. *et al.* Exogenous enzymes in diets for broilers. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 2, p. 149-161, 2016.

DELMASCHIO, I. B. Enzimas na alimentação de animais monogástricos. **Revista Científica de Medicina Veterinária - UNORP**, v. 2, n. 1, p. 6-20, 2018.

DELIBERADOR L. R. *et al.* Perdas e desperdícios de alimentos ao longo da cadeia de suprimentos: uma análise de regiões desenvolvidas e em desenvolvimento. **South American Development Society Journal**, v. 4, n. 01, p. 11-27, 2018.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Fermentação em Estado Sólido. São Paulo, Editora **Edgard Blücher Ltda**, v. 2, cap. 13, p. 247, 2001.

ELWINGER, K. *et al.* A brief history of poultry nutrition over the last hundred years. World's, **Poultry Science Journal**, v. 72, p. 701-720, 2016.

EVANGELISTA, D. E. **Estudos funcionais e estruturais de pectinases e xilanases com potencial para aplicações biotecnológicas**. Tese (doutorado), Instituto de física de São Carlos. Programa de Pós- Graduação em Física, Universidade de São Paulo, p. 157, 2017.

FARAG M. A *et al.* Laranjas doces e amargas: uma revisão comparativa atualizada de seus bioativos, nutrição, qualidade alimentar, méritos terapêuticos e práticas de valorização de biorresíduos, **Food Chemistry**, v. 331, p. 127-306, 2020.

FU L. *et al.* Variations in soil microbial community structure and extracellular enzymatic activities along a forest-wetland ecotone in high-latitude permafrost regions. **Ecology and Evolution**, v. 13, n. 6, e 10205, 2023.

GOMES, B. K.; CONY, B. S. L.; STELLA, L. Enzimas exógenas na alimentação de suínos. Revista Eletrônica. **Nutritime**, v. 16, n. 3, p. 8477-8487, 2019.

IGBASAN, W. GUENTER E BA SLOMINSKI. O efeito da suplementação com pectinase e α -galactosidase no valor nutritivo da ervilha para frangos de corte. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 77, n. 3, p. 537-539, 1997.

INFANTE, J. C. **Imobilização e caracterização bioquímica de mananases e pectinases produzidas por *Aspergillus brasiliensis*: potencial para aplicação na clarificação de sucos de frutas**. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, p. 129, 2019.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.

KUMAR, A., DHIMAN, S., KRISHAN, B. *et al.* Enzimas microbianas e principais aplicações na indústria alimentícia: uma revisão concisa. *Food Production, Process and Nutrition*, v. 6, p. 85, 2024.

KUVVET, C.; UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Improvement of Pectinase Production by Co-culture of *Bacillus* spp. Using Apple Pomace as a Carbon Source. *Waste and Biomass Valorization*, v. 10, n 5, p. 1241-1249, 2019.

KUBRA, K. T. *et al.* Aplicações potenciais de pectinases nos setores alimentício, agrícola e ambiental. J. Pharm. *Chemico Biological Science*. v. 6, p. 23–34, 2018.

KASHYAP, D. R. *et al.* Aplicações de pectinases no setor comercial: uma revisão. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 215–227, 2001.

KC, S. *et al.* Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains, *Fermentação*, v. 6, n. 2, p. 59, 2020.

PACHECO-QUITO, E. -M; RUIZ-CARO, R.; VEIGA, M.-D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications, *Marine drugs*, v. 18, p. 583, 2020.

LATARULLO, M. B. *et al.* Pectins, endopolygalacturonases, and bioenergy. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 1401, 2016.

LAURIANE P. *et al.* Carbohydrate-active enzymes in animal feed, *Biotechnology Advances*, v. 65, 2023.

- LEPORINI M. *et al.* Espécies cítricas: ingredientes modernos para alimentos funcionais e produtos nutracêuticos, Revista *Italiana Journal of Food Science*, v. 33, ed. 2, p. 63–107, 2021.
- MACIEL, J. T. L. *et al.* Enzimas exógenas sobre a microbiota intestinal: a expressão de genes e o desempenho de frangos de corte. *Ciência Animal*, v.30, n.2, p.138-152, 2020.
- MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication. *Microbiological Research*, v. 240, 2020.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, p. 274-288, 2012.
- MAHESH, M. *et al.* Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater. Catalysis B: Enzymatic. *Journal of molecular*, v. 133, p. 43-54, 2016.
- MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 98, 2008.
- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. ***Trichoderma: uso na agricultura***. Brasília, DF: Embrapa, p. 536, 2019.
- MOREIRA, A. M. Bioeconomia: plataforma mundial de inovação e sustentabilidade nas cadeias agroindustriais. Revista *Processos Químicos*, v. 10, n. 20, p. 351-353, 2016.
- MORIN-CRINI, N. *et al.* Aplicações da quitosana em alimentos, produtos farmacêuticos, medicina, cosméticos, agricultura, têxteis, celulose e papel, biotecnologia e química ambiental. *Environmental Chemistry Letters*, v. 17, p. 1667–1692, 2019.
- MORRIS, G. A.; FOSTER, T. J.; HARDING, S. E., A hydrodynamic study of the depolymerization of a high methoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydrate Polymers*. UK, v. 48, p. 361-367, 2002.
- NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *Journal of Chromatography B, Analyt Technol Biomed Life Science*, v. 1025, p. 16-24, 2016.

ORTIZ, A. R. N. *et al.* **A importância da ambiência na criação de frangos de corte: revisão de literatura.** XXVI Seminário Interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão. Ciência e inovação em um mundo de transformação, 2021.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer.** 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

POLETTTO, P. **Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo.** Tese (doutorado), Instituto de biotecnologia. Programa de pós-graduação em biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, p. 139, 2015.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. *Biologia vegetal.* 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAZA, A.; BASHIR, S.; TABASSUM, R. An update on carbohydrases: growth performance and intestinal health of poultry. ***Heliyon***, v. 5, n. 4, p. 14-37, 2019

RIAZ S. *et al.* *Citrus: an overview of food uses and health benefits.* In: *Citrus Research – Horticultural and Human Health Aspects.* Avanços na produção e pesquisa de citros. Londres, Reino Unido: **IntechOpen**, 2022.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, P. O. *et al.* Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes, ***Renewable Energy***, v. 145, p. 2683-2693, 2020.

RUSSO C. *et al.* A segunda vida dos resíduos de frutas cítricas: uma valiosa fonte de compostos bioativos, ***Moléculas***. v. 26, p. 1–20, 2021.

SAJISH S. *et al.* A low-cost and sustainable approach to microbial pectinase production from fruit processing wastes: from peel to profit. ***Environ Technol.*** v. 15, p. 1-18, 2025.

SALEH, F. *et al.* A mixture of pure cellulase, hemicellulase and pectinase improves broiler performance. ***British Poultry Science***, v. 46, n. 5, p. 602–606, 2005.

SANT'ANNA JR., G. L. Produção de enzimas microbianas. Em: LIMA, U. A., AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coords). Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora Edigard Blucher. Série **Biotecnologia Industrial**, v. 3, cap. 14, 2001.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2007.

SANTOS NETO, L. D. *et al.* Use of different combinations of enzyme complexes in broiler diets. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 42, n. 5, p. 2907-2924, 2021.

SILVA, G. B. **Extração e Quantificação de pectina a partir da farinha da casca do maracujá**. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA – Assis, v. 20, 2013.

SILVA, A. **Análise da secagem de Limão Tahiti (citrus Latifolia - TANAKA) em fatias e de suas frações: epicarpo, mesocarpo e endocarpo**. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

SILVA, C. C. *et al.* Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira como substrato para produção de pectinase por cogumelos. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, Curitiba, v.4, n.4, p. 5042-5060. 2021.

SINGH, B. *et al.* Production of multi enzyme preparation by *Bacillus subtilis* using mosambi peel as substrate. *Journal of Environmental Biology*, v. 43, p. 612-621, 2022.

SOUSA, T. O. *et al.* Use of proteases for animal feed supplementation: Scientific and technological updates. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 1-14, 2025.

SUHAIMI, H. *et al.* Fungal Pectinases: Production and Applications in Food Industries. Fungi in Sustainable Food Production, *Fungal Biology*, Chapter 6, p. 85-115, 2021.

TAHIR, M. *et al.* An effective combination of carbohydrases that enables reduction of dietary protein in broilers: importance of hemicellulase. *Poultry Science*, v. 87, n. 4, p. 713–718, 2008.

TEDESCO, D. E. A. *et al.* Resíduos de mercados atacadistas de frutas e vegetais: Caracterização de segurança e nutricional para seu potencial de reutilização na nutrição animal. *Sustainability*. v. 13, p. 94-78, 2021.

TONOLLI, P. N.; FRANCO, F. F.; SILVA, A. F. G. **A construção histórica do conceito de enzima e sua abordagem em livros didáticos de biologia.** História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p.727- 744, 2021.

YU, B. *et al.* Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. *Animal Feed Science and Technology*, v.134, p.283-294, 2007.

VALENÇA, E. **Ambiência nos aviários e sua importância para a avicultura.** Avicultura do Nordeste, 2023.

VAZ, J. *et al.* Características do trato digestivo, metabolizabilidade e desempenho de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de complexo enzimático. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 72, n. 3, p. 1069-1074, 2020.

VIANA, D. S. LIMÃO (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. **Tahiti, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos in natura e clarificados por membranas de microfiltração.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer ar starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 97-104, 2006.

XUE W. *et al.* Mechanism of improved cellulase production by *Trichoderma reesei* in water-supply solid-state fermentation, *Bioresour Technol.* v. 419, 2025.

YADAV, S. K. *et al.* Pectina liase: uma revisão. *Process Biochem.* v. 44, p. 1–10, 2009.

ZEMA D. A. *et al.* Valorização de resíduos do processamento de citros: uma revisão. *Gestão de Resíduos*, v. 80, p. 252–73, 2018.

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PECTINASES POR *Trichoderma* spp. UTILIZANDO CASCA DE LIMÃO COMO SUBSTRATO

O artigo será submetido à revista Preparative Biochemistry & Biotechnology, classificada como Qualis CAPES A4 na área de Zootecnia, com fator de impacto 1,9.

RESUMO:

Objetivou-se produzir e caracterizar pectinases produzidas por *Trichoderma* spp. utilizando casca de limão como substrato e purificar essa enzima utilizando sistema de duas fases aquosas. Dentre os fungos testados, o *Trichoderma orientale* UFPI18 destacou-se no processo fermentativo com 3,0 gramas de substrato, umidade de 50%, temperatura 35°C por 24h, com atividade de pectinase e atividade específica de 1,20 U/ml e 83,75 U/mg, respectivamente. As melhores condições de purificação apresentou PEG 1.500 g/mol, 17% de PEG, 18% de sal (fosfato de sódio) e pH 8, obtendo coeficiente de partição $K=0,82$, recuperação de 93,35%, fator de purificação de 1,85 (fase sal), e massa molecular de 46,0 kDa. A enzima pectinase apresentou uma temperatura de 50°C e teve sua atividade acrescida em presença de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Na^{+} , enquanto a enzima purificada apresentou uma tendência geral de redução da atividade na presença da maioria dos íons testados quando comparada ao seu próprio controle, com exceção do Cobalto, que manteve a atividade original, enquanto o Ba^{+} mostrou forte inibição, tanto no extrato bruto, tanto o purificado. A cinética demonstrou que a enzima purificada apresenta maior vantagem quando o substrato está em concentrações elevadas (k_{cat} maior $2,896\ s^{-1}$ e K_m mais elevado $(0,264\text{mg/mL})$). A termodinâmica mostrou-se favorável em ambos os casos (enzima bruto e purificada), com energia livre de ativação $(0,19\ \text{kJ/mol})$, sugerindo que a purificação não alterou a eficiência global da enzima. A avaliação de citotoxicidade demonstrou que a enzima possui efeito não tóxico. Esses resultados indicam que a produção de pectinases a partir de casca de limão é um processo sustentável e de grande potencial associada com purificação por sistema aquoso bifásico, da combinação de bom rendimento e seletividade da enzima reforça seu potencial para aplicação de aditivo em rações para frangos de corte.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido; pectinase; sistema de duas fases aquosas; *Trichoderma*.

ABSTRACT:

The objective was to produce and characterize pectinases produced by *Trichoderma* spp. using lemon peel as a substrate and to purify this enzyme using a two-phase aqueous system. Among the fungi tested, *Trichoderma orientale* UFPI18 stood out in the fermentation process with 3.0 grams of substrate, 50% moisture, and a temperature of 35°C for 24 hours, with pectinase activity and specific activity of 1,20 U/ml and 83,75 U/mg, respectively. The best purification conditions presented PEG 1.500 g/mol, 17% PEG, 18% salt (sodium phosphate), and pH 8, obtaining a partition coefficient $K = 0,82$, a recovery of 93,35%, a purification factor of 1,85 (salt phase), and a molecular mass of 46,0 kDa. The pectinase enzyme showed a temperature of 50°C and its activity increased in the presence of Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Na^{+} , while the purified enzyme showed a general tendency to reduce activity in the presence of most of the ions tested when compared to its own control, with the exception of Cobalt, which maintained its original activity, while Ba^{+} showed strong inhibition, both in the crude and purified extracts. Kinetic analysis demonstrated that the purified enzyme exhibits a greater advantage when the substrate is at high concentrations (k_{cat} greater than $2,896\text{ s}^{-1}$ and K_m higher ($0,264\text{mg/mL}$)). Thermodynamics showed favorable results in both cases (crude and purified enzyme), with a free energy of activation ($0,19\text{kJ/mol}$), suggesting that purification did not alter the overall efficiency of the enzyme. Cytotoxicity assessment demonstrated that the enzyme has a non-toxic effect. These results indicate that the production of pectinases from lemon peel is a sustainable process with great potential. The combination of good yield and selectivity of the enzyme reinforces its potential for application as an additive in broiler chicken feed.

Keywords: Solid-state fermentation; pectinase; aqueous two-phase system; *Trichoderma*.

1 INTRODUÇÃO

Os setores agroindustriais geram grandes quantidades de resíduos de biomassa gerados ao longo das cadeias agroindustriais, como cascas de laranja, casca de limão, folhas, agregando-se como sobras do processo produtivo (Deliberador *et al.*, 2018). Para melhor aproveitamento desses resíduos agroindustriais temos como alternativa empregá-los como substrato no cultivo de microrganismos, em especial os fungos, estimulando a bioprodução de enzimas de interesse comercial para sua aplicação como aditivos na ração animal (Abdullah *et al.*, 2018).

Devido à alta demanda por bioprodutos tem apresentado crescimento significativo principalmente no que diz respeito às enzimas, que são utilizadas para bioconversão de substâncias em produtos de interesse para a agricultura e a indústria e tem recebido crescente atenção devido à versatilidade de aplicações, incluindo a modificação da viscosidade de alimentos, produção de etanol, extração de DNA e isolamento de protoplastos vegetais, além de serem biocompatíveis e ambientalmente seguras (Shrestha *et al.*, 2021).

Dentre as enzimas comercialmente produzidas destacam-se as enzimas pectinolíticas ou pectinases, é um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar substâncias pécicas. Essas enzimas atuam na degradação de pectina e de outros polissacarídeos pécicos, promovendo a liberação de ácido galacturônico (Suhaimi *et al.*, 2016).

Dentre os tipos de fermentação para produção de fungos, a fermentação em estado sólido (FES) é mais adequada, no qual o crescimento microbiano é estimulado em um ou mais substratos secos, com pouca ou sem nenhuma presença de água livre, tendo o necessário para atender as demandas metabólicas do microrganismo. A FES tem despertado interesse porque produz um menor volume de efluentes e oferece condições semelhantes ao habitat do microrganismo fúngico, onde se encontra mais adaptado e, conseqüentemente, mais produtivo (Rodrigues *et al.*, 2020).

Entre os métodos de purificação enzimática, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) se destaca por ser de baixo custo e sustentável, por apresentar fases aquosas e baixa tensão interfacial, oferece um ambiente biocompatível que favorece a partição e estabilidade das enzimas (Nascimento *et al.*, 2016). Essas soluções formam duas fases líquidas distintas, sendo uma fase rica em componentes hidrofóbicos e outra fase rica em componentes hidrofílicos. Essa característica do SDFA permite a separação seletiva de biomoléculas, como as enzimas, a partir de uma mistura complexa, facilitando sua extração e purificação (Buarque *et al.*, 2023).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo a produção de pectinases produzidas por *Trichoderma* spp. utilizando casca de limão como substrato por fermentação em estado sólido e purificação das enzimas por sistema de duas fases aquosas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e tratamento do substrato para fermentação

Como substratos para o processo fermentativo foram utilizadas cascas de limão (*Citrus limon*), no qual foram obtidas da região local, foram lavadas e higienizadas com água destilada e depois secas em estufa a 50°C até completa desidratação em seguida armazenada em recipientes plásticos em temperatura ambiente. Após esse período, foram padronizadas para uma granulometria contida entre as peneiras de 1,0 e 2,0 mm e em seguida armazenadas em recipientes plásticos.

2.2 Microrganismos, meios de manutenção e esporulação

Foram utilizadas 16 linhagens, todas previamente identificadas como pertencentes ao gênero *Trichoderma* isoladas na área de transição Cerrado–Caatinga (SISGEN A8431AA). Os microrganismos foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados a 30 °C em estufa tipo BOD, por sete dias, até a completa esporulação. A preservação das linhagens foi realizada pelo método de Castellani (1939).

2.3 Preparação do inóculo

As espécies fúngicas foram repicadas em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubadas a 30°C por 10 dias, em estufa até a completa esporulação. A contagem de esporos foi realizada por microscopia óptica utilizando câmara de Neubauer, e a suspensão foi ajustada para uma concentração final de 1×10^7 esporos/mL.

2.4 Seleção do fungo para produção de pectinases

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo as cascas de limão (autoclavados previamente a 20 min por 121°C), em seguida foram umedecidas com solução nutritiva (0,5% extrato de levedura e 1% de glicose), as cepas foram incubadas em BOD a 30°C por três dias, para atingir uma umidade de 40% e inoculados a uma concentração de 10^7 esporos por mL, frascos Erlenmeyer de 125 mL foram inoculados

com esporos fúngicos contendo 3 gramas de casca de limão e autoclaves para a produção de enzimas.

O protocolo de extração das enzimas foi realizado conforme Nascimento *et al.*, (2016), onde foi adicionado tampão fosfato 245 mM pH 7,0 posteriormente após a adição, os erlenmeyers foram agitados em 120 rpm por 1 hora. Após esse período, foi realizada a filtração em gases estéreis e o líquido filtrado com posterior centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (extrato enzimático) foi armazenado em freezer para posteriores análises.

2.5 Planejamento fatorial para produção de pectinases por FES

Após o isolado que apresentou maior atividade de pectinase ter sido selecionado foi realizado um o planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis estudadas: quantidade de resíduo, umidade e temperatura conforme a Tabela 1 para o processo de escolha das melhores condições para produção de pectinases. O processo de extração foi o mesmo mencionado no item 2.4 e os extratos enzimáticos de cada ensaio foram utilizados para as determinações analíticas.

Tabela 1. Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^3 para produção das pectinases por fermentação em estado sólido.

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Quantidade de resíduo (g)	3	5	7
Temperatura (°C)	25	30	35
Umidade (%)	30	40	50

2.6 Determinação da atividade de pectinase

A atividade de pectinase foi determinada pela atividade da poligalacturonase (PG) de acordo com a metodologia de Li *et al.* (2015) baseada na metodologia de Miller (1959), sendo adaptada neste estudo para pequenos volumes. Para o ensaio foi utilizada 50µL do extrato enzimático e 450µL da solução do substrato em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,8 foram adicionados em tubos de ensaio, incubados por 30 minutos a 50°C, para ocorrer a reação enzimática.

Para interromper a reação, foram adicionados 1,5 ml de ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) ao ensaio, foi incubado por 10 minutos a 95°C. Os tubos foram resfriados em banho de

gelo. As leituras da absorbância da amostra foram realizadas no leitor de espectrofotômetro a 540 nm. Para o branco foram utilizado 50µl do tampão citrato de sódio 0,1 M pH 4,8 e 450 µl da solução de substrato. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão de glicose.

2.7 Quantificação de proteínas

A quantificação total de proteína das amostras foram determinada de acordo com o método descrito por Smith *et al.* (1985), sendo utilizado uma curva de soro albumina bovina. Cada experimento foi realizado em triplicata, e os resultados, após correção contra amostras em branco, foram expressos como valores médios.

2.8 Determinação do melhor tempo de produção de pectinase por planejamento fatorial 2³

A partir da melhor condição obtida no ensaio da melhor condição do planejamento experimental, foi realizada a avaliação temporal da produção da pectinase e atividade específica da enzima. As análises foram conduzidas nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação, a fim de determinar atividade enzimática ao longo do tempo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.9 Purificação da pectinase através do sistema de duas fases aquosas (SDFA) polietilenoglicol /Sal

Para a purificação da pectinase foi utilizado o SDFA, eles foram preparados em tubos cônicos graduados de 15 mL com diferentes concentrações de soluções de mistura de sais de fosfato de sódio e 50% (p/p) de soluções de polietilenoglicol a 25°C ± 2 conforme o planejamento fatorial 2⁴ (Tabela 2), onde foram analisadas as variáveis: massa molar de PEG (MM_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}), pH e concentração de sal (C_{SAL}) sobre as variáveis respostas: coeficiente de partição (K), recuperação (Y) e fator de purificação (FP).

Tabela 2. Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2⁴ para produção das pectinases por fermentação em estado sólido.

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Massa Molar do PEG (MM _{PEG})	1500	3350	8000
Concentração do PEG (C _{PEG})	12	15	17

pH	6	7	8
Concentração de fosfato (C_{sal})	12	15	18

Em seguida, foram adicionados 1 grama do extrato bruto contendo a pectinase, correspondente a 20% (m/m) da massa total do sistema. Esse extrato corresponde ao material obtido nas condições de produção previamente otimizada, conforme descrito no item 2.1, e no tempo de fermentação ideal determinado pelo estudo de cinética de produção da pectinase. Os tubos foram homogeneizados e mantiveram em repouso por 60 minutos para ocorrência da decantação das fases. Após esse período, os volumes das fases foram mensurados e alíquotas foram retiradas com auxílio de pipetas, para evitar mistura dos líquidos. Essas amostras foram então analisadas quanto à concentração de proteínas e à atividade de pectinase, permitindo o cálculo das variáveis de resposta: coeficiente de partição (K), fator de purificação (FP) e recuperação (Y).

O coeficiente de partição da pectinase (K) foi determinada pela razão entre as atividades da pectinase na fase superior (F_{PEG}) e na fase inferior (F_{SAL}):

$$K = \frac{F_{PEG}}{F_{SAL}}$$

A recuperação enzimática (Y) foi determinada como a razão da atividade pectinolítica na fase superior (AP_{PEG}) ou inferior (AP_{SAL}) sobre seu respectivo volume (V_{PEG}) ou (V_{SAL}), tudo isso sobre a atividade pectinolítica presente no extrato bruto (AP_{bruto}) dividida pelo seu respectivo volume do extrato adicionado no sistema e posteriormente multiplicado por 100 para representação da recuperação em porcentagem:

$$Y = \left(\frac{\frac{AP_{PEG}}{V_{PEG}} \text{ ou } \frac{AP_{SAL}}{V_{SAL}}}{AP_{bruto}} \right) \times 100$$

O fator de purificação (FP) foi definido como a atividade específica da pectinase presente da fase PEG (AE_{PEG}) ou sal (AE_{SAL}) sobre a atividade específica do extrato bruto (AE_{bruto}):

$$FP = \frac{AE_{PEG}/AE_{SAL}}{AE_{bruto}}$$

Após essas análises foi realizado a análise das influências de todas as variáveis (massa molar, concentração do PEG, pH e concentração do sal) sobre a purificação da pectinase pelo SDFA.

2.10 Caracterização bioquímica da pectinase

2.10.1 Efeito do pH na atividade da pectinase

O efeito do pH sobre a atividade da pectinase presente no extrato bruto e da enzima purificada pelo sistema de duas fases aquosas (SDFA), na fase rica em sal, foram avaliados utilizando diferentes sistemas tampão na concentração de 0,1 M, de acordo com a metodologia de Nascimento *et al* (2016). Para isso, o extrato enzimático (500 µL) foram misturado com 500 µL de tampões em diferentes faixas de pH, conforme descrito a seguir: tampão acetato de sódio-ácido acético (pH 3,0 a 5,0); tampão citrato-fosfato (pH 5,0 a 7,0); tampão glicina-NaOH (pH 8,0 a 11,0). As misturas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Após esse período, a atividade enzimática residual da pectinase foi determinada de acordo com o método descrito na Seção 2.6.

2.10.2 Efeito da temperatura na atividade da pectinase

O efeito da temperatura sobre a atividade da pectinase presente no extrato bruto e da enzima purificada pelo sistema de duas fases aquosas (SDFA), na fase rica em sal, foi avaliado por meio da determinação da atividade pectinolítica em diferentes condições térmicas, foi avaliado de acordo com a metodologia de Nascimento *et al* (2016). Para isso, as reações enzimáticas foram conduzidas nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C, por 60 minutos. Após o período de reação, a atividade da pectinase foi determinada conforme o método descrito na Seção 2.6.

2.10.3 Efeito de íons metálicos sobre a atividade pectinolítica

O efeito de diferentes íons sobre a atividade da pectinase foi avaliado de acordo com a metodologia de Nascimento *et al.* (2016), tanto no extrato bruto quanto na enzima purificada pelo sistema de duas fases aquosas. Para isso, soluções iônicas foram preparadas na concentração de 5 mM. As amostras enzimáticas foram expostas aos seguintes sais: sulfato de ferro (FeSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4), sulfato de sódio (Na_2SO_4), sulfato de magnésio

(MgSO₄), sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato de manganês (MnSO₄), cloreto de alumínio (AlCl₃), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cobalto (CoCl₂) e cloreto de bário (BaCl₂).

As misturas reacionais foram preparadas na proporção 1:1, utilizando-se extrato enzimático (contendo pectinase no extrato bruto ou purificada pelo SDFA) e a respectiva solução iônica. Em seguida, as amostras foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Após o período de incubação, alíquotas foram retiradas para a determinação da atividade pectinolítica, conforme metodologia descrita na Seção 2.6. O controle experimental consistiu na substituição das soluções iônicas por água destilada, mantendo-se as condições de incubação.

2.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada utilizando um gel de corrida de poliacrilamida a 12%, de acordo com o método de Laemmli (1970), que consiste na avaliação do peso molecular da enzima purificada.

2.12 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e k_{cat})

A velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) da pectinase presente no extrato bruto quanto da enzima purificada pelo SDFA, na fase rica em sal foram determinadas utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk, que se utilizava da Equação 1, plotado a partir das velocidades de reação em diferentes concentrações de ácido poligalacturônico (0,1 a 0,8%), (Michaelis e Menten, 1913; Lineweaver e Burk, 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: K_m – constante de Michaelis-Menten, v - velocidade da reação, $V_{m\acute{a}x}$ – velocidade máxima da reação e $[S]$ – concentração de substrato.

A constante catalítica (k_{cat}) foi determinada por meio da Equação 2, Briggs e Haldane (1925).

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima da reação e $[E]$ é a concentração de proteínas expressas em (mg/mL).

2.13 Parâmetros termodinâmicos da reação

Os valores de energia livre de transição e de ligação ao substrato foram determinados através das Equações 3 e 4, respectivamente, reportadas nos trabalhos de Saleem *et al.* (2005).

$$\Delta G^{\ddagger}_{E-T} = -RT \ln(k^{cat}/K_m) \text{ (Equação 3)}$$

$$\Delta G^{\circ}_{E-T} = -RT \ln k_a \text{ (Equação 4)}$$

Onde: R é a constante universal dos gases, T é a temperatura de referência no qual foi realizada o experimento (50°C) e $K_a = 1/K_m$.

2.14 Diferença de energia livre de ativação ($\Delta\Delta G^{\ddagger}$)

A diferença entre as energias livres de ativação proposta por Eyring (1935) da pectinase no extrato bruto e após o processo de purificação pelo SDFA foi expressa pela variação da energia livre de transição ($\Delta\Delta G^{\ddagger}$), conforme a Equação 5:

$$\Delta\Delta G^{\ddagger} = \Delta G^{\ddagger}_{\text{extraída pelo SDFA}} - \Delta G^{\ddagger}_{\text{bruto}} \text{ (Equação 5)}$$

Onde: $\Delta G^{\ddagger}_{\text{purificada}}$ corresponde à energia livre de ativação da enzima extraída pelo SDFA e $\Delta G^{\ddagger}_{\text{bruto}}$ refere-se à energia livre de ativação da pectinase presente no extrato bruto. Essa abordagem permitiu avaliar o efeito do processo de purificação sobre a barreira energética da reação e, consequentemente, sobre a eficiência catalítica da enzima (Pauling, 1946).

2.15 Ensaio de citotoxicidade

Células de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231) e fibroblastos (L929) foram obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem celular MDA-MB-231 foi mantida em meio Leibovitz L-15 e meio F-12 (50% de cada), com 2 mM de L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB), sem CO₂. A linhagem

celular L929 foi mantida em meio Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de SFB e 5% de CO₂.

As células foram contadas em câmara de Neubauer para teste de viabilidade celular. Um ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) foi utilizado para determinar a viabilidade celular da pectinase CP-TO, seguindo a metodologia de Mosmann (1983). As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/mL e, após 24 h de incubação, a pectinase foi exposta por 24 h em concentrações finais de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,90 µg/mL.

Após o período de exposição, foram adicionados 20µL de solução de MTT (4 mg/mL) e as placas foram incubadas por 2 a 3 h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (BioteK Elx808, Basel, Suíça) a 630 nm. A citotoxicidade foi expressa como viabilidade celular:

$$\frac{\text{Absorbância das células tratadas} \times 100}{\text{Absorbância das células não tratadas}}$$

2.16 Análise estatística

Os efeitos foram avaliados por meio de uma análise de variância com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$) para estimar os efeitos principais e de segunda ordem, o valor absoluto dos fatores em relação às variáveis de resposta estudadas. A análise estatística do delineamento experimental foi realizada utilizando o software Statistical 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção do fungo filamentoso para a produção de pectinase

Na Tabela 3, são apresentados os resultados da produção de pectinases por diferentes espécies de *Trichoderma*. Das 16 linhagens avaliadas, apenas uma (*Trichoderma* sp. T1 – UFPI 04) não apresentou atividade pectinolítica detectável. Entre as demais linhagens produtoras, observou-se ampla variação na atividade enzimática, com valores entre 0,07 e 2,82 U/mL. As maiores atividades foram registradas para *Trichoderma koningiopsis* (UFPI 16), com 2,18U/mL e *Trichoderma* sp. (UFPI 13), com 2,82 U/mL. Estes resultados foram

diferentes encontrados por Nurin *et al.*, 2024, utilizando o fungo *Aspergillus flavus* para produzir pectinase a partir da casca de limão. Nusrat *et al.*, 2021, utilizando com casca de laranja como substrato, a maior atividade de pectinase foi observada para *Trichoderma longibrachiatum* (TMK22) com 14,77U/mL.

Tabela 3. Seleção dos *Trichoderma* produtores de pectinase utilizando a casca do limão como substrato fermentado por três dias.

Identificação	Espécies de <i>Trichoderma</i>	Atividade de Pectinase (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
UFPI 01	<i>T. orientale</i>	0,27	41,22
UFPI 02	<i>T. longibrachiatum</i>	0,07	50,40
UFPI 03	<i>T. koningiopsis</i>	1,31	39,33
UFPI 04	<i>T. sp. T1</i>	-	-
UFPI 05	<i>T. sp. T2</i>	1,19	42,25
UFPI 06	<i>T. sp. T3</i>	0,20	7,13
UFPI 07	<i>T. koningiopsis</i>	1,23	68,68
UFPI 08	<i>T. sp. T4</i>	0,44	23,73
UFPI 09	<i>T. orientale</i>	0,07	3,16
UFPI 10	<i>T. koningiopsis</i>	1,80	54,59
UFPI 11	<i>T. sp. T5</i>	0,83	71,44
UFPI 13	<i>T. sp. T6</i>	2,82	49,59
UFPI 14	<i>T. orientale</i>	0,94	17,68
UFPI 16	<i>T. koningiopsis</i>	2,18	44,90
UFPI 17	<i>T. orientale</i>	1,23	36,65
UFPI 18	<i>T. orientale</i>	1,20	83,75

U - $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$

Em relação à atividade específica, os valores observados variaram de 3,16 a 83,75U/mg, com destaque para os isolados UFPI 18 (*Trichoderma orientale*), que apresentou 83,75U/mg, e *Trichoderma sp.* (UFPI 11), com 71,44U/mg. Esses resultados são comparáveis aos relatados por Nusrat *et al.* (2021), que, utilizando cascas de laranja como substrato em fermentação em estado sólido com *Trichoderma longibrachiatum* TMK19, obtiveram atividade específica de 123U/mg. No mesmo estudo, os isolados *T. longibrachiatum* TTK3 e TTK6 apresentaram valores ainda mais elevados, de 498,5U/mg e 1008,5U/mg,

respectivamente, evidenciando o elevado potencial produtivo de diferentes linhagens do gênero.

Embora os valores reportados na literatura sejam superiores em alguns casos, é importante destacar que as linhagens avaliadas no presente estudo foram isoladas de uma região de ecótono entre dois biomas brasileiros, Caatinga e Cerrado. Trata-se de um ambiente de elevada diversidade ecológica e ainda pouco explorado quanto ao potencial biotecnológico de fungos produtores de enzimas. Dessa forma, a produção de pectinases observada nesses isolados evidencia a capacidade metabólica adaptativa de espécies de *Trichoderma* provenientes de condições ambientais particulares, reforçando o caráter inédito do estudo e o potencial desses microrganismos como fontes promissoras de enzimas com aplicações industriais. Pinheiro *et al.* (2017) também relataram a produção de pectinase por *Neosartorya glabra* utilizando casca de limão-taiti como substrato, com atividade de $3,78 \pm 0,25$ U/mL, reforçando a aplicabilidade de resíduos cítricos na obtenção dessas enzimas.

Nesse sentido, os achados de Martínez-Trujillo *et al.* (2011), ao avaliarem a produção de pectinases por *Aspergillus flavipes* FP-500 e *Aspergillus terreus* FP-370 em diferentes resíduos de frutas cítricas, observaram que as maiores atividades foram obtidas quando a casca de limão foi utilizada como substrato, evidenciando seu elevado potencial indutor. Os autores destacaram ainda que valores de pH ácido associados a altas concentrações de fonte de carbono favoreceram a produção de exopectinases e endopectinases, enquanto pH mais elevado e baixa concentração de carbono estimularam a síntese de enzimas como pectina liase e ramnogalacturonase, permitindo ajustar o perfil enzimático conforme o objetivo do processo fermentativo.

Sendo assim, os achados de Martínez-Trujillo *et al.* (2011) corroboram a estratégia adotada no presente trabalho, no qual a casca de limão também foi utilizada como substrato para indução da produção de pectinases por linhagens de *Trichoderma*. A utilização desse resíduo agroindustrial representa uma alternativa de baixo custo e elevada disponibilidade, além de favorecer a síntese de enzimas pectinolíticas devido à alta concentração de pectina presente na casca. Dessa forma, o emprego de resíduos cítricos não apenas potencializa a produção enzimática, mas também se insere em uma abordagem sustentável de reaproveitamento de subprodutos, contribuindo para o desenvolvimento de bioprocessos com maior viabilidade econômica e menor impacto ambiental.

Embora *Trichoderma* sp. (UFPI 13) tenha apresentado a maior atividade de produção de pectinase (2,82U/mL), sua atividade específica foi inferior (49,59U/mg). Em contrapartida, o isolado UFPI 18, apesar de exibir menor (1,20U/mL), apresentou a maior atividade específica (83,75U/mg), indicando que o extrato produzido possui maior concentração de pectinase ativa por quantidade de proteína total. Esse parâmetro é particularmente desejável quando se busca um extrato enzimático mais eficiente e com maior grau de pureza. Além disso, a elevada atividade específica torna-se um aspecto relevante considerando a aplicação pretendida da enzima como aditivo enzimático na alimentação animal, uma vez que produtos comerciais são frequentemente padronizados e expressos em unidades de atividade por massa de proteína ou sólido (U/mg), facilitando a dosagem e a incorporação em formulações de rações. Dessa forma, extratos com maior atividade específica podem demandar menores quantidades de material para atingir a atividade desejada, aumentando a viabilidade tecnológica e econômica do uso em dietas de frangos de corte.

Resultados semelhantes foram obtidos por Awan *et al.* (2022), que utilizaram casca de laranja como substrato em fermentação em estado sólido e registraram atividade de 9,2U/mL com *Trichoderma asperellum*, evidenciando que resíduos cítricos são eficientes para maximizar a atividade específica dessas enzimas. Kaul *et al.* (2024), em revisão recente, ressaltaram que o uso de resíduos agroindustriais, incluindo cascas de limão, na síntese de pectinases não apenas reduz os custos associados a substratos comerciais, mas também representa uma abordagem sustentável dentro do conceito de economia circular, promovendo o reaproveitamento de recursos e minimizando impactos ambientais. Diante desses resultados, o isolado UFPI 18 (*Trichoderma orientale*) foi selecionado para dar continuidade aos ensaios de caracterização bioquímica e purificação da pectinase.

3.2 Avaliação das variáveis de cultivo na produção de pectinase por *Trichoderma orientale* utilizando planejamento fatorial 2³

Após o processo de seleção do fungo com maior potencial produtor de pectinase, o isolado *Trichoderma orientale* (UFPI 18) foi submetido a um planejamento fatorial 2³, com o objetivo de avaliar as melhores condições de produção da enzima (Tabela 4). Verificou-se que as temperaturas ideais para o crescimento do fungo foi 25 e 35°C, com produção de pectinase variando de 0,39 a 1,50 U/mL e atividade específica variando de 1,58 a 4,82U/mg. Observou-se variação na produção de pectinase entre 0,39 e 1,50U/mL, e na atividade específica entre

1,58 e 4,82U/mg, evidenciando o efeito das condições experimentais sobre o desempenho enzimático.

Tabela 4. Planejamento fatorial 2^3 para a produção da pectinase com o fungo *Trichoderma orientale* utilizando casca de limão como substrato fermentado por três dias.

Ensaio	Quantidade de resíduo (g)	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Pectinase (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	3	30	25	1,50	4,17
2	7	30	25	0,75	2,41
3	3	50	25	0,86	3,05
4	7	50	25	0,39	1,58
5	3	30	35	0,87	2,27
6	7	30	35	0,81	2,60
7	3	50	35	1,45	4,82
8	7	50	35	0,42	1,86
9 C	5	40	30	0,60	2,04
10 C	5	40	30	0,87	2,74
11 C	5	40	30	0,79	2,34
12 C	5	40	30	0,70	2,35

C – Pontos centrais; Negrito – ensaios com maior produção de pectinase; U - $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$.

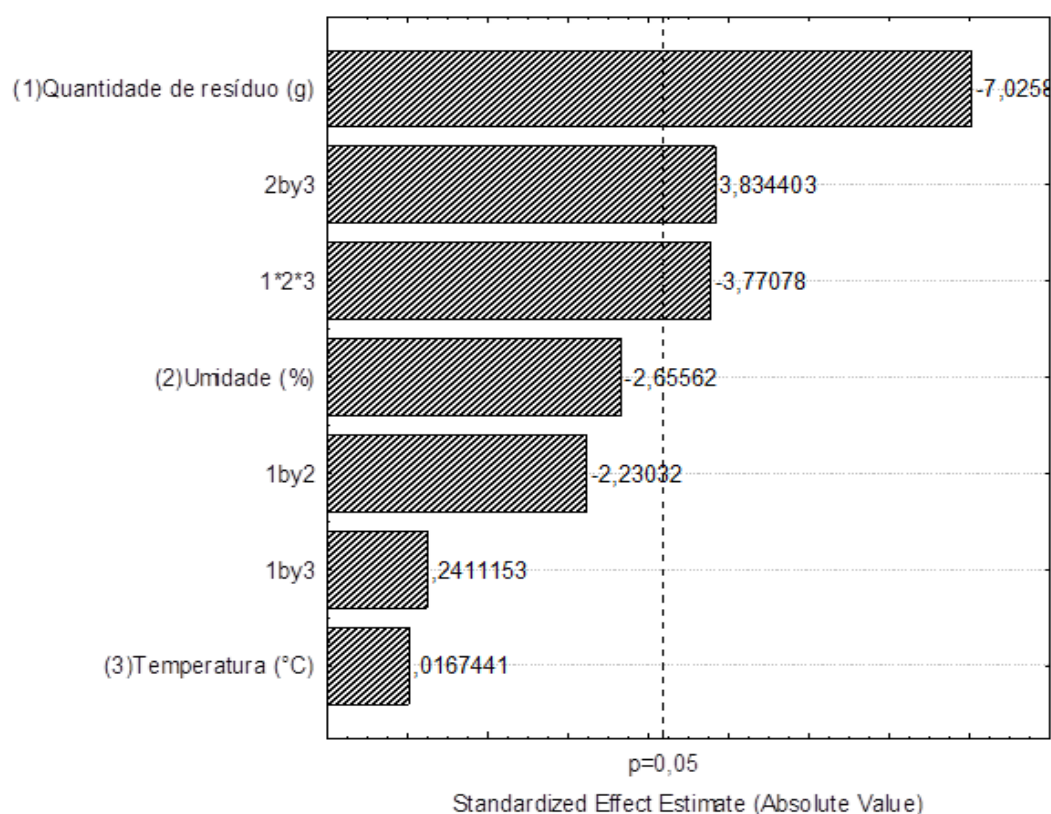
Em estudo comparativo avaliando diferentes substratos para produção de pectinase, Priya *et al.* (2022) isolaram 8 espécies fúngicas (*Fusarium solani*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus oryzae* e *Fusarium oxysporum*). Os autores testaram quatro diferentes substratos como fontes de carbono (casca de limão, casca de laranja, casca de mosambi (lima doce) e farelo de arroz. Especificamente, *Fusarium solani* cultivado em meio Sabouraud suplementado com casca de limão como fonte de carbono alcançou máxima de pectinase de 3,0U/mL em pH 4,5 e peptona 1,5% como fonte de nitrogênio após seis dias de fermentação, representando título 1,5 a 2,0 vezes superior à produção obtida com casca de laranja (2,0U/mL), casca de mosambi (1,5 U/mL) ou farelo de arroz (1,0 U/mL) sob condições idênticas.

Observa-se que a menor quantidade de substrato (3g) promoveu os maiores valores de produção (1,50 U/mL) e atividade específica (4,82U/mg), enquanto o aumento para 7g reduziu consistentemente ambos os parâmetros. A interação observada entre temperatura e umidade confirma a natureza multifatorial da FES. A 25 °C, o melhor desempenho ocorreu com 30% de umidade, enquanto a 35 °C a condição ótima foi 50%. A elevada atividade específica observada na condição 35 °C, 50% de umidade e 3g de resíduo (4,82 U/mg) sugere maior eficiência catalítica relativa e possível redução na produção de proteínas inespecíficas. De acordo com revisões recentes, condições subótimas de umidade ou excesso de substrato podem induzir estresse metabólico e alterar o perfil proteico secretado (Kumar *et al.*, 2023). Assim, a melhor condição simultânea dos fatores físicos favorece não apenas o rendimento, mas também a qualidade bioquímica da enzima produzida.

Através do gráfico de pareto apresentado a seguir na Figura 1, podemos observar que a quantidade de resíduo foi à única variável isolada que influenciou na produção da pectinase, sendo a influência negativa, este resultado indica que menor quantidade de substrato favorece maior produção de pectinase pelo *Trichoderma orientale* UFPI18, indicando que a disponibilidade do substrato rico em pectina desempenha papel central na indução da síntese de pectinases. Este resultado valida princípios de regulação gênica em fungos filamentosos, nos quais pectina funciona como indutor catabólico de genes estruturais pectinásicos (Darabzadeh *et al.*, 2018).

Em fungos filamentosos, a produção de enzimas extracelulares frequentemente é regulada por mecanismos de indução por substrato, nos quais a presença de polímeros estruturais da parede celular vegetal, como a pectina, estimula a expressão de genes codificadores de pectinases. Entretanto, quando o substrato está presente em concentrações muito elevadas, pode ocorrer repressão catabólica por carbono, reduzindo a síntese dessas enzimas degradativas (Shiny *et al.*, 2022).

Figura 1. Efeitos das variáveis independentes (temperatura, volume e umidade) sobre a produção de pectinases por *Trichoderma orientale* crescido em casca de limão fermentado por três dias.



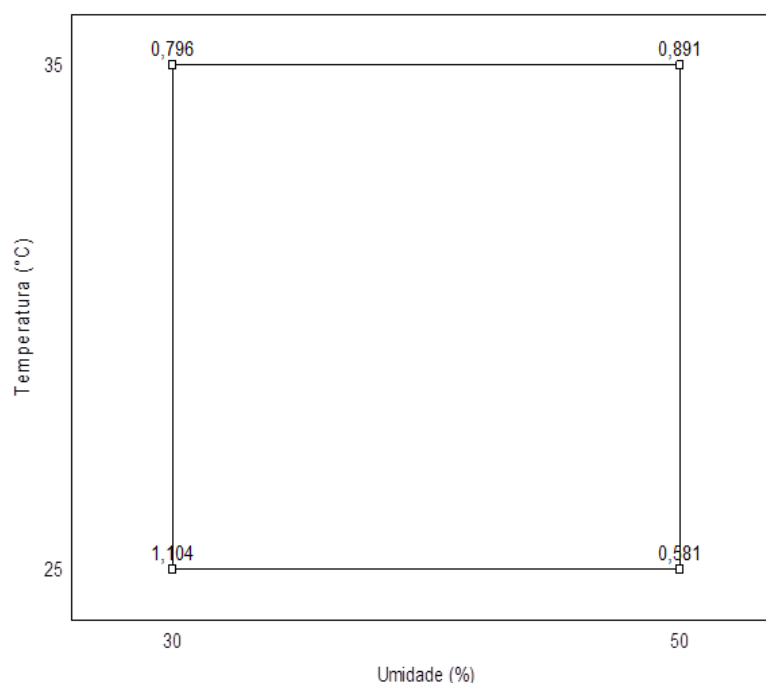
Diferentes estudos demonstram que a concentração de substrato é um dos principais fatores que regulam a produção de pectinases em processos fermentativos. Em sistemas de fermentação utilizando resíduos ricos em pectina, como cascas de frutas cítricas, a otimização da concentração do substrato é essencial para maximizar a produção enzimática, pois níveis excessivos podem afetar o metabolismo microbiano e reduzir a eficiência da secreção enzimática (Ahmed *et al.*, 2021).

Em contraste, a umidade e a temperatura, quando analisadas isoladamente, não estatisticamente significativas sobre a produção enzimática. No entanto, a importância relativa das variáveis demonstra serem dependente do microrganismo e substrato estudados: enquanto Darabzadeh *et al.* (2018) documentaram umidade como fator preponderante em *Aspergillus flavus* para produção de celulase (com umidade ótima entre 65-77%), Rasit *et al.* (2021) encontraram temperatura como principal determinante em *Aspergillus* spp. para produção de pectinase em análise de Pareto.

Dentre as interações avaliadas, a combinação entre umidade e temperatura foi a mais significativa, apresentando efeito positivo (Figura 1). Essa interação indica que a produção de

pectinase é favorecida quando ambas as variáveis se encontram no mesmo nível experimental. Assim, combinações como alta umidade associada à alta temperatura, ou baixa umidade associada à baixa temperatura, tendem a resultar em maiores respostas, conforme evidenciado no gráfico de interação (Figura 2). Esse comportamento também foi observado por Rasit *et al.* (2021), que, ao otimizar a produção de pectinase em fermentação em estado sólido, verificaram que a máxima atividade enzimática foi alcançada apenas quando múltiplas variáveis foram ajustadas simultaneamente.

Figura 2. Gráfico de interação entre umidade e temperatura na produção de pectinase pelo *Trichoderma orientale* UFPI 18.

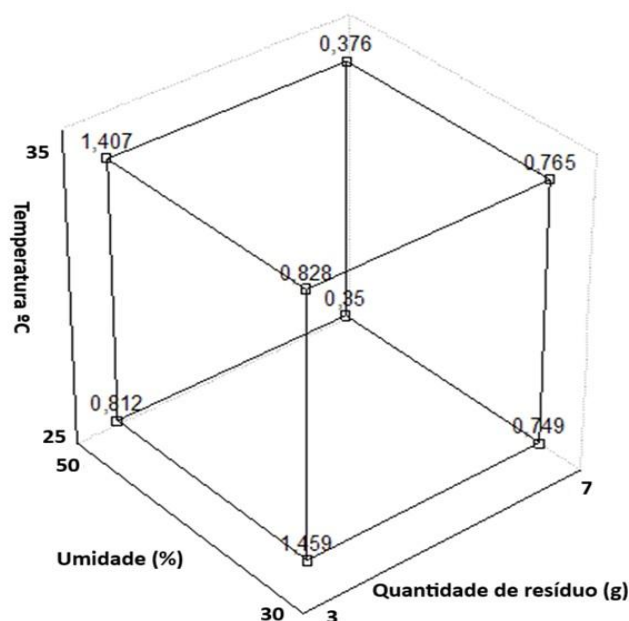


Observa-se que o maior valor de resposta (1,10) ocorreu na condição de 30% de umidade associada a temperatura de 25°C. Por outro lado, o menor valor (0,58) foi registrado na combinação de 50% de umidade e 25% de temperatura. Na temperatura de 35°C, os valores foram 0,796 para 30% de umidade e 0,89 para 50% de umidade. A interação entre umidade e temperatura pode ser explicada pelo fato de que níveis adequados de umidade favorecem a difusão de nutrientes, o crescimento micelial e a acessibilidade do fungo à fração de pectina presente na casca de limão, potencializando a expressão enzimática. Dessa forma, ajustes simultâneos desses fatores tornam-se essenciais para a maximização da produção de pectinases.

Adicionalmente, na Figura 3 observou-se uma interação significativa envolvendo temperatura, quantidade de resíduo e umidade, com efeito negativo sobre a resposta. A quantidade de resíduo demonstrou efeito negativo sobre a variável resposta. Em todas as combinações avaliadas, o aumento de 3g para 7g promoveu redução nos valores observados. Temperatura de 25°C e 30% de umidade, a resposta reduziu de 1,45 para 0,74; a 25°C e 50% de umidade, de 0,81 para 0,35; e a 35°C e 50% de umidade, de 1,40 para 0,376.

Observou-se ainda interação entre temperatura e umidade. Na temperatura de 25°C e 30% de umidade. Entretanto, a 35°C, a maior umidade (50%) resultou em maior valor da variável resposta. Adicionalmente, verifica-se evidência de interação tripla (temperatura x umidade x quantidade de resíduo), uma vez que o desempenho ótimo depende simultaneamente dos três fatores. A condição de 3 g de resíduo foi determinante para que os efeitos positivos da combinação entre temperatura e umidade se manifestassem, enquanto a utilização de 7g comprometeu a resposta em todas as situações avaliadas. Esse resultado indica que, embora a disponibilidade de substrato e a umidade sejam determinantes para a produção enzimática, condições térmicas inadequadas podem comprometer o metabolismo do fungo e a eficiência da síntese de pectinases, anulando os efeitos positivos dessas variáveis. Esse comportamento reforça o papel da temperatura como um fator modulador do sistema, capaz de influenciar a estabilidade enzimática e a regulação fisiológica do microrganismo.

Figura 3. Gráfico cúbico das variáveis (temperatura, umidade e quantidade de resíduo), tendo como variável-resposta à produção de pectinase pelo *Trichoderma orientale* UFPI 18.



Sendo assim, os resultados demonstram que a produção de pectinases por *Trichoderma orientale* em casca de limão é controlada principalmente pela sinergia entre quantidade de resíduo e umidade, sendo a temperatura um fator condicionante que deve ser controlado para evitar efeitos antagonistas. Por isso, esses achados destacam a importância da melhor condição simultânea das variáveis de cultivo em processos biotecnológicos voltados à produção de enzimas pectinolíticas a partir de resíduos agroindustriais.

Os dados evidenciam que a quantidade de substrato foi o fator de maior impacto, seguida da interação entre temperatura x umidade. A condição mais promissora combinou baixa carga de resíduo e ajuste adequado de umidade conforme a temperatura, demonstrando que a melhor condição integrada dos parâmetros físicos é essencial para maximizar a produção e a eficiência da pectinase em FES. Sendo assim levando em consideração os valores de produção e a atividade específica da enzima o ensaio 7 foi o que apresentou as melhores condições de produção da pectinase, com uma temperatura de 35°C, umidade de 50% e uma quantidade de resíduo de 3 gramas e atividade específica de 4,82U/mg foi selecionado para dar sequência aos demais testes.

3.3 Avaliação temporal da produção de pectinase

Com base nas condições estabelecidas no ensaio 7 do planejamento fatorial (3g de resíduo, 50% de umidade e 35°C), foi realizada a curva de fermentação de *Trichoderma orientale* (UFPI 18) para avaliar o perfil temporal de produção de pectinase. Conforme

apresentado na Tabela 5, observou-se que a maior atividade enzimática foi obtida após 24 horas de fermentação, atingindo 0,85U/mL, acompanhada também do maior valor de atividade específica (43,58U/mg). A partir desse período, verificou-se uma redução na atividade pectinolítica nos tempos subsequentes, com valores entre 0,36 e 0,41U/mL entre 48 e 96 horas. Esse comportamento sugere que a síntese de pectinase ocorre nas fases iniciais do crescimento fúngico, possivelmente associada ao metabolismo primário e à rápida utilização da pectina presente na casca de limão como fonte de carbono.

Tabela 5. Caracterização da produção de pectinases produzidas pelo fungo *Trichoderma orientale* UFPI 18 crescido em casca de limão nas condições de 3g de resíduo, 50% de umidade e 35°C.

Tempo de fermentação (horas)	Pectinase (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
24	0,85	43,58
48	0,39	10,86
72	0,36	14,71
96	0,41	0,03

U - $\mu\text{mol/min/mL}$; U/mg - Unidade por miligrama de proteína.

A diminuição da produção enzimática ao longo do tempo pode estar relacionada ao esgotamento de nutrientes disponíveis no meio, à repressão catabólica por produtos liberados durante a hidrólise, ou ainda à possível degradação da enzima por proteases secretadas em estágios mais avançados da fermentação. Dessa forma, os resultados indicam que o tempo de 24 horas representa o ponto ótimo para a recuperação da pectinase produzida por *T. orientale* UFPI18, contribuindo para a definição de condições mais eficientes de bioprocessos.

Em 96 horas de fermentação, embora a atividade da pectinase (0,41U/mL) tenha se mantido em níveis comparáveis aos tempos intermediários (48 e 72 horas), observou-se uma queda expressiva da atividade específica (0,03U/mg). Comportamento este que corresponde com o relatado por Satapathy *et al.* (2021) que observaram pico de produção de pectinase por *Aspergillus parvisclerotigenus* às 168 h ($1642,21 \pm 19,56\text{U/mL}$), seguido de declínio abrupto para $1172,09 \pm 15,1\text{U/mL}$ em 192 h, atribuído à depleção de nutrientes e acúmulo de produtos metabólicos inibitórios no meio fermentativo.

De modo geral, os resultados indicam que o tempo de fermentação exerce influência decisiva sobre a eficiência produtiva das pectinases por *T. orientale*, sendo 24 h o período mais favorável para obtenção de elevada atividade e pureza relativa da enzima. Enquanto períodos prolongados (>96 h) resultam em diluição da fração enzimática pela liberação de proteínas estruturais, enzimas proteolíticas e metabólitos secundários. Esses achados reforçam o potencial da casca de limão como substrato indutor e evidenciam a viabilidade de processos fermentativos de curta duração para a produção de pectinases, contribuindo para a redução de custos operacionais e maior eficiência biotecnológica (El Enshasy *et al.*, 2018).

3.4 Purificação da enzima através do Sistema de Duas Fases Aquosas (Polietilenoglicol-fosfato de sódio)

A Tabela 6 apresenta os resultados do planejamento fatorial completo 2^4 para a purificação da pectinase em sistema de duas fases aquosas (SDFA) utilizando polietilenoglicol (PEG) e fosfato de sódio. Foram avaliadas as diferentes combinações de massa molar do PEG (MM_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}), pH e concentração de sal (C_{SAL}). Os resultados mostram que a purificação da pectinase em SDFA foi diretamente influenciada pela massa molar e concentração de PEG, além da concentração de sal e pH.

Tabela 6. Purificação de pectinase de *Trichoderma orientale* UFPI 18 por sistema de duas fases aquosas (polietilenoglicol/fosfato de sódio).

Ensaio	MM _{PEG}	C _{PEG} (%)	C _{Sal} (%)	pH	AP _{PEG} (U)	AP _{Sal} (U)	K	Y _{PEG} (%)	Y _{Sal} (%)	FP _{PEG}	FP _{Sal}	BM (%)
1	1500	12	12	6	0,274	0,147	1,863	99,917	48,731	0,652	0,191	64,90
2	8000	12	12	6	0,218	0,199	1,095	65,042	85,761	0,492	1,118	55,98
3	1500	17	12	6	0,249	0,251	0,992	99,055	83,209	0,482	1,130	87,12
4	8000	17	12	6	0,186	0,205	0,907	73,993	61,163	0,361	0,923	86,88
5	1500	12	12	8	*	*	*	*	*	*	*	*
6	8000	12	12	8	0,585	0,172	3,401	242,416	79,827	1,005	0,653	102,25
7	1500	17	12	8	0,195	0,163	1,196	84,037	54,036	0,394	1,060	90,22
8	8000	17	12	8	0,406	0,227	1,788	181,700	86,540	0,977	1,085	78,84
9	1500	12	18	6	0,295	0,194	1,520	127,134	45,019	0,497	1,145	108,42
10	8000	12	18	6	0,226	0,182	1,241	74,921	78,435	0,384	0,836	82,60
11	1500	17	18	6	0,252	0,213	1,183	75,186	70,611	0,444	1,360	71,64
12	8000	17	18	6	0,300	0,163	1,840	119,343	43,228	0,528	1,050	95,76
13	1500	12	18	8	0,306	0,222	1,378	91,297	88,314	0,510	1,405	75,78
14	8000	12	18	8	0,257	0,126	2,039	119,277	37,593	0,481	0,776	105,00
15	1500	17	18	8	0,210	0,256	0,820	90,502	93,353	0,354	1,854	108,16
16	8000	17	18	8	0,435	0,156	2,788	187,468	77,573	0,929	0,772	85,54
17C	3350	15	15	7	0,310	0,167	1,856	128,460	58,130	0,601	0,738	90,50
18C	3350	15	15	7	0,322	0,126	2,555	138,770	45,947	0,549	0,790	107,12
19C	3350	15	15	7	0,251	0,210	1,195	99,850	76,578	0,426	0,655	99,36
20C	3350	15	15	7	0,256	0,111	2,306	101,839	47,836	0,437	0,475	98,64

MM_{PEG} = Massa molar do PEG; C_{PEG} = Concentração do PEG; C_{Sal} = Concentração de Sal; AP_{PEG} = Atividade pectinase da fase PEG; AP_{sal} = Atividade pectinase da fase sal; K = Coeficiente de partição; Y_{PEG} = Recuperação da pectinase na fase PEG; Y_{SAL} = Recuperação da pectinase na fase Sal; C = Pontos centrais; FP_{PEG} = Fator de purificação da pectinase na fase PEG; FP_{SAL} = Fator de purificação da pectinase na fase Sal.

3.4.1 Influência do coeficiente de partição (K) no processo de purificação da pectinase

Os valores do coeficiente de partição (K) variaram entre 0,82 e 3,40. Na maioria dos ensaios (ensaios 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 e 20), observou-se que a pectinase particionou preferencialmente para a fase superior rica em PEG ($K > 1$), indicando uma tendência de maior afinidade da enzima por essa fase e demonstrando que as condições do sistema podem influenciar sua distribuição entre as fases. Essa preferência da pectinase pela fase superior rica em polietilenoglicol (PEG) pode estar relacionada às interações hidrofóbicas e estéricas estabelecidas entre a proteína e o polímero, bem como à influência da força iônica promovida pela fase salina.

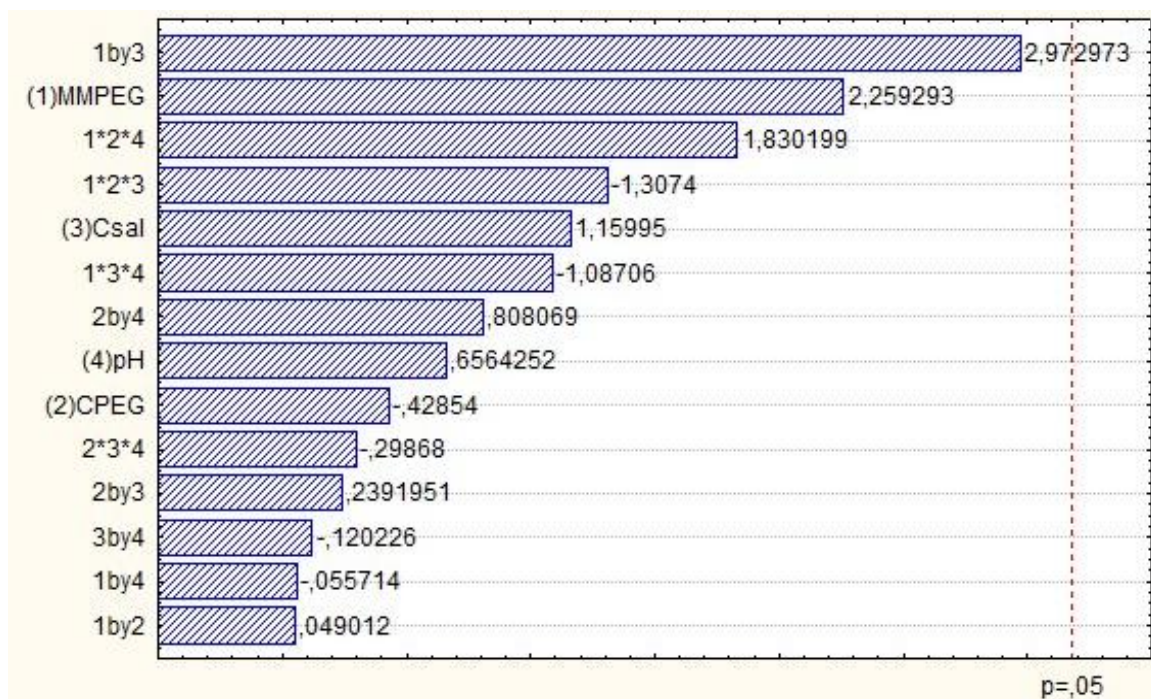
Apenas três ensaios apresentaram valores de $K < 1$, ensaio 3 (0,99), ensaio 4 (0,90) e ensaio 15 (0,82), indicando uma maior distribuição da enzima na fase inferior, rica em fosfato de sódio. Resultados semelhantes foi relatado por Antov *et al.* (2004), que ao utilizarem um sistema polietilenoglicol de 4000 g/mol e sal - sulfato de amônio para o particionamento de endopoligalacturonase, observaram que a enzima apresentou maior afinidade pela fase rica em sal, corroborando que, dependendo das condições do sistema, pectinases podem migrar preferencialmente para a fase inferior.

De acordo com Albertsson (1986), a partição de biomoléculas em sistemas de duas fases aquosas depende de propriedades como hidrofobicidade superficial, carga elétrica e tamanho molecular. Assim, proteínas com maior compatibilidade com o ambiente polimérico tendem a se concentrar na fase superior, fase PEG (Johansson *et al.*, 1998). Além disso, alterações nas concentrações de PEG e sal modificam parâmetros físico-químicos importantes do sistema, como polaridade, densidade, volume das fases e potencial eletrostático, impactando diretamente a distribuição da enzima e a seletividade do processo (Rito-Palomares, 2004). Dessa forma, a predominância da pectinase na fase rica em PEG sugere condições favoráveis para sua recuperação e purificação parcial no sistema avaliado.

Entretanto, conforme indicado pelo gráfico de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 4), nenhum dos fatores avaliados apresentou efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) sobre o coeficiente de partição nas condições estudadas, embora a Massa molar do PEG (MM_{PEG}) e algumas interações tenham apresentado os maiores efeitos estimados. Esse resultado sugere que, apesar das variações observadas nos valores de K ,

os efeitos das variáveis independentes foram moderados dentro da faixa experimental considerada, sendo possível que estudos adicionais com faixas mais amplas ou maior número de repetições sejam necessários para melhor discriminar a influência de cada fator.

Figura 4. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição (K) da pectinase.



MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG; Cs_{al} – Concentração de sal; C_{PEG} – Concentração do polietilenoglicol, pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

Nascimento *et al.* (2018) também demonstraram que sistemas compostos por PEG 1500 g/mol combinado com sal (citrato de sódio) podem promover a partição de α -amilase para a fase salina, reforçando que a distribuição enzimática pode variar conforme os parâmetros físico-químicos do sistema. Silvério *et al.* (2013) relataram coeficientes de partição entre $K=0,27$ e $0,60$ para lacase em sistemas copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno (UCON) com sal (fosfato), indicando maior concentração da enzima na fase salina, padrão semelhante ao observado no ensaio 15 (Tabela 6) que apresentou um $K=0,82$.

Já o ensaio 6 apresentou o maior coeficiente de partição ($K=3,40$), indicando uma partição 3,4 vezes preferencial para a fase rica em PEG. Resultado semelhante foi encontrado por Maciel (2013), que observou preferência de pectinase endo-PG pela fase

superior em sistemas poliméricos ($K > 1$), corroborando a afinidade da enzima pela fase rica em polímero em determinadas condições.

3.4.2 Avaliação da recuperação enzimática (Y) sobre o processo de purificação da pectinase

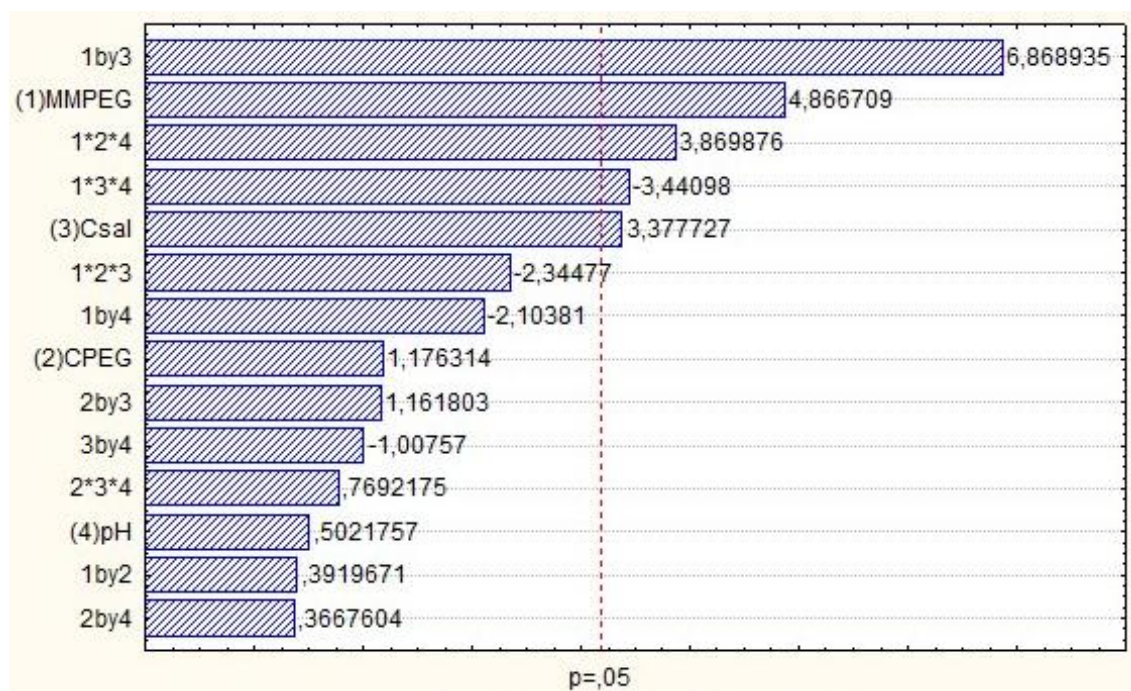
Quanto à recuperação enzimática (Y), os valores obtidos variaram de 65,04 a 242,42% para a fase rica em PEG (Y_{PEG}) e de 37,59 a 93,35% para a fase rica em sal (Y_{SAL}). Esses resultados demonstram que as condições do sistema de duas fases aquosas influenciaram significativamente a retenção e a distribuição da atividade catalítica da pectinase entre as fases.

Destacam-se, neste estudo, os ensaios 6 e 15, uma vez que apresentaram comportamentos contrastantes quanto à partição da enzima. O ensaio 6 exibiu o maior coeficiente de partição ($K=3,40$), indicando migração preferencial da pectinase para a fase superior rica em PEG. Em contrapartida, o ensaio 15 apresentou o menor valor de K (0,82), evidenciando maior distribuição da atividade enzimática na fase inferior rica em sal. Esses ensaios foram selecionados para discussão detalhada devido aos valores expressivos obtidos para as variáveis respostas, especialmente recuperação e fator de purificação.

No ensaio 6, foi observada uma recuperação elevada na fase PEG, com $Y_{PEG}=242,41\%$, ou seja, superior a 100%. Esse comportamento pode estar associado a um efeito de concentração e possível ativação da pectinase, resultante da remoção de compostos inibitórios não proteicos presentes no extrato bruto, especialmente aqueles oriundos da casca de limão utilizada como substrato fermentativo. Nesse mesmo ensaio, a recuperação na fase salina foi de $Y_{SAL}=79,82\%$, indicando que apenas uma fração menor da enzima permaneceu na fase inferior, em decorrência de sua afinidade preferencial pela fase rica em PEG.

Na Figura 5, o gráfico de Pareto referente à recuperação enzimática na fase rica em PEG (Y_{PEG}) evidencia que os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão predominantemente associados às interações entre os componentes do sistema.

Figura 5. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da pectinase na fase PEG.

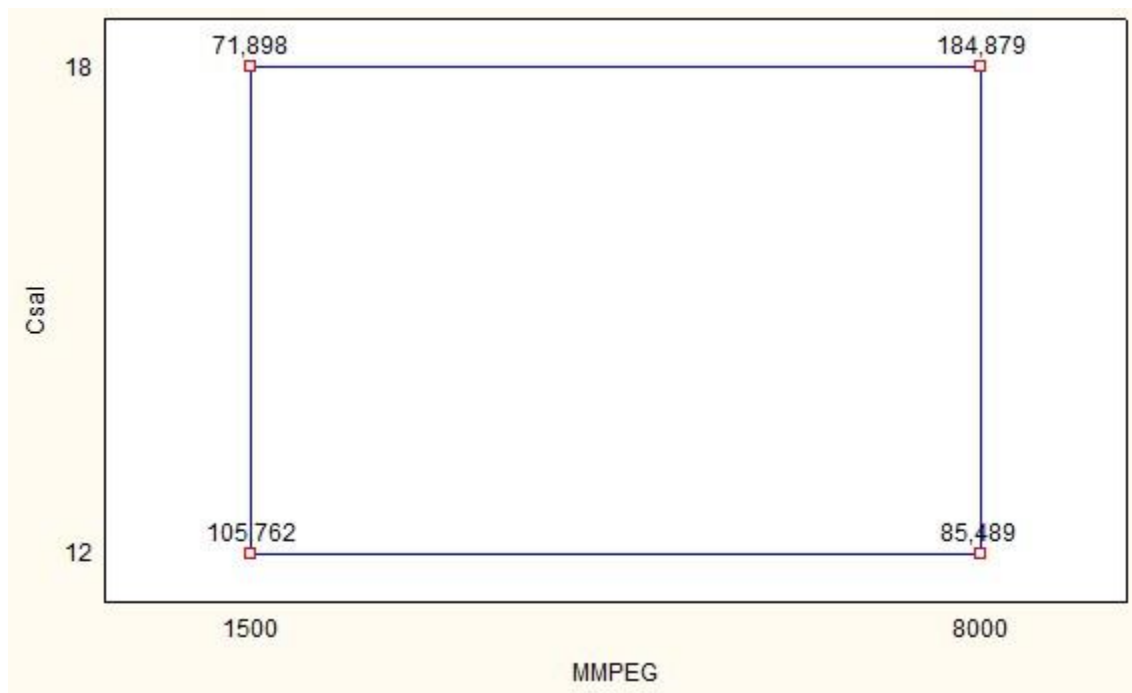


MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG; C_{sal} – Concentração de sal; C_{PEG} – Concentração do polietilenoglicol, pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

A interação entre a concentração de PEG e a concentração de sal (1x3) foi o fator de maior influência, evidenciando que a recuperação da pectinase depende do balanço simultâneo entre polímero e sal. Esse comportamento pode ser mais bem visualizado no gráfico de interação apresentado na Figura 6, que relaciona a massa molar do PEG (MM_{PEG}) e a concentração de sal (C_{sal}) sobre os valores médios preditos de recuperação na fase PEG (Y_{PEG}).

Observa-se que o aumento da massa molar do PEG de 1500 para 8000 promoveu variações expressivas na recuperação enzimática, porém esse efeito ocorreu de maneira dependente da concentração de sal empregada. Em condições de maior concentração salina ($C_{sal}=18\%$), a elevação da MM_{PEG} resultou em um aumento significativo da recuperação, atingindo valores médios preditos superiores a 180%, indicando maior concentração da enzima na fase superior.

Figura 6. Gráfico de interação entre a C_{sal} e MM_{PEG} na recuperação da pectinase na fase PEG.



C_{sal} – Concentração de sal e MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG.

Por outro lado, em menor concentração de sal ($C_{sal}=12\%$), o comportamento foi distinto, com valores de recuperação mais moderados e sem o mesmo ganho observado na condição salina elevada. Esses resultados confirmam a presença de um efeito interativo entre MM_{PEG} e C_{sal} , demonstrando que a eficiência do SDFA na recuperação da pectinase não é determinada isoladamente por um único fator, mas sim pela combinação entre o tamanho do polímero e a força iônica do sistema.

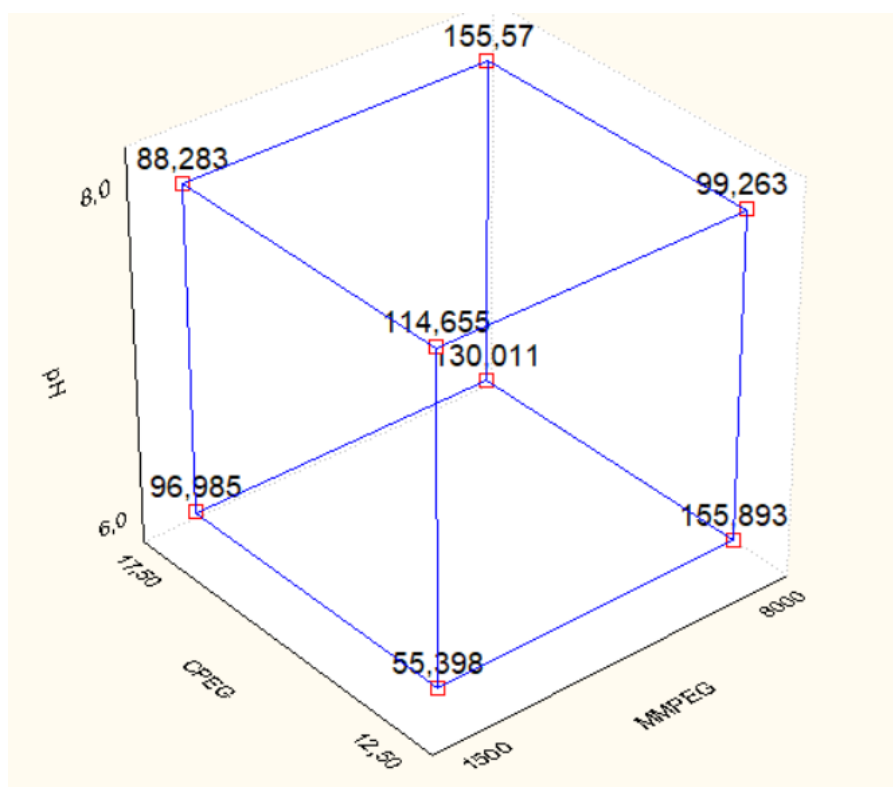
Esse efeito pode estar associado ao aumento da exclusão estérica promovida por PEGs de maior massa molar, aliado ao fenômeno de *salting-out* intensificado em maiores concentrações de fosfato, favorecendo a migração e estabilização da pectinase na fase rica em PEG.

Ainda observando a Figura 5, a massa molar do PEG (MM_{PEG}) apresentou efeito positivo significativo, sugerindo que polietilenoglicol de maior tamanho favorecem a exclusão estérica e a migração da enzima para a fase superior. A concentração de sal também se mostrou relevante, possivelmente devido ao aumento da força iônica e ao efeito de *salting-out*. Por outro lado, o pH não apresentou efeito isolado significativo, indicando que sua influência ocorre principalmente por meio de interações com as

demais variáveis. Esses resultados confirmam que a recuperação da pectinase no SDFA é governada por efeitos combinados entre composição polimérica e condições físico-químicas do sistema.

O gráfico cúbico apresentado na Figura 7 permite avaliar simultaneamente os efeitos combinados da massa molar do PEG (MM_{PEG}), da concentração de PEG (C_{PEG}) e do pH sobre a recuperação enzimática na fase superior (Y_{PEG}). Observa-se que os valores de recuperação variaram amplamente entre aproximadamente 55% e 156%, evidenciando a forte dependência do sistema em relação às condições operacionais.

Figura 7. Gráfico cúbico das variáveis (pH, concentração do PEG e Massa molar do PEG), tendo como variável resposta a recuperação da pectinase.



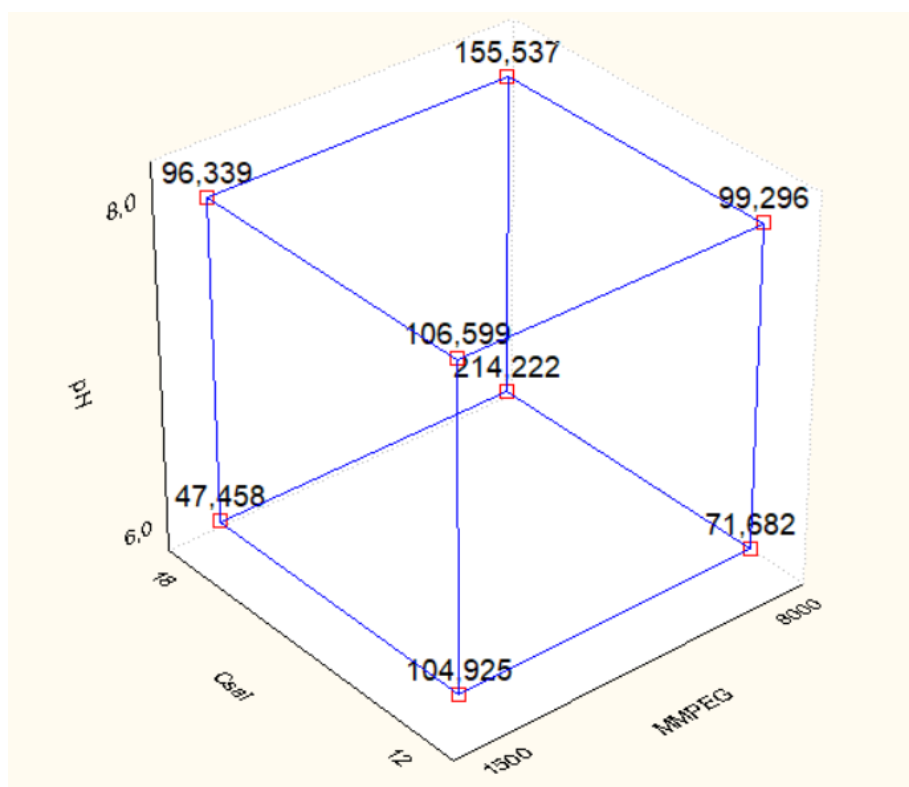
MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG; C_{PEG} – Concentração do polietilenoglicol, pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

As maiores recuperações foram obtidas em combinações envolvendo PEG de maior massa molar, sugerindo que o aumento da exclusão estérica favorece a migração e concentração da pectinase na fase rica em polímero. Além disso, o pH também modulou a resposta, indicando possível influência na estabilidade e nas interações eletrostáticas da enzima. De forma geral, o gráfico confirma que a recuperação da

pectinase no SDFA é resultado de efeitos interativos entre as variáveis, reforçando o caráter multifatorial do processo de purificação.

Já o gráfico cúbico apresentado na Figura 8 permite avaliar simultaneamente os efeitos combinados que também foram significativos da massa molar do PEG (MM_{PEG}), da concentração de sal (C_{sal}) e do pH sobre a recuperação enzimática da pectinase na fase superior rica em PEG (Y_{PEG}). Observa-se que os valores médios preditos variaram amplamente, entre aproximadamente 47,46% e 155,54%, evidenciando que a recuperação enzimática é fortemente dependente do balanço entre essas variáveis físico-químicas.

Figura 8. Gráfico cúbico das variáveis (pH, concentração do sal e Massa molar do PEG), tendo como variável resposta a recuperação da pectinase.



MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG; C_{sal} – Concentração de sal e pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

De maneira geral, nota-se que as maiores recuperações ocorreram em condições envolvendo MM_{PEG} elevada (8000 g/mol) associada a níveis mais altos de sal e pH, atingindo valores superiores a 155%. Esse comportamento sugere que PEGs de maior massa molar intensificam o efeito de exclusão estérica, favorecendo a migração da

pectinase para a fase superior, enquanto a maior força iônica promovida pela concentração salina contribui para o fenômeno de *salting-out*, reduzindo a solubilidade da proteína na fase inferior e impulsionando sua concentração na fase PEG.

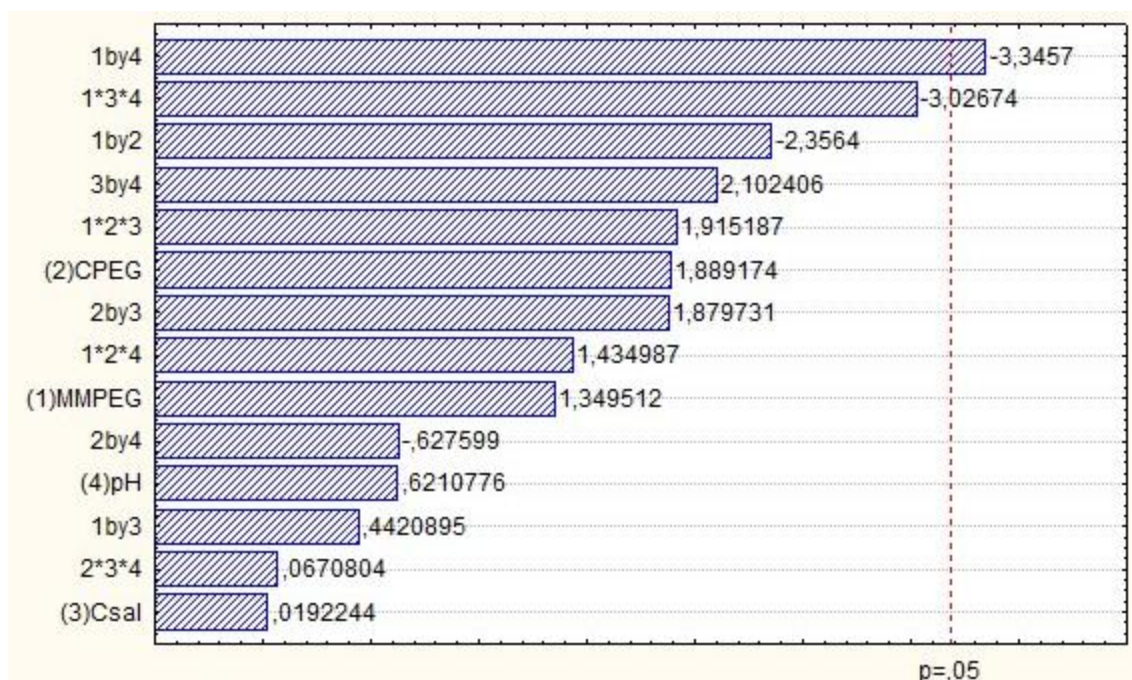
Por outro lado, a menor recuperação observada (~47,46%) está associada a combinações envolvendo condições menos favoráveis de pH e concentração de sal, indicando que níveis reduzidos de força iônica podem diminuir a eficiência do sistema na separação e recuperação da enzima. Além disso, o efeito do pH mostra-se relevante no comportamento do sistema, uma vez que alterações na ionização dos grupos superficiais da pectinase podem modificar suas interações com o polímero e com a fase salina, impactando diretamente sua distribuição entre as fases.

Em contraste, o ensaio 15, no qual a enzima migrou para a fase salina, apresentou rendimentos mais equilibrados entre as fases, com recuperação de $Y_{PEG}=90,50\%$ e $Y_{SAL}=93,35\%$, sugerindo uma distribuição mais homogênea da atividade enzimática e maior estabilidade do SDFA sob condições de pH 8 e elevada concentração de sal. Os resultados deste trabalho indicaram recuperações superiores, sobretudo na fase PEG, sugerindo maior compatibilidade da pectinase com as condições do sistema empregado.

A análise estatística da recuperação enzimática na fase salina (Y_{SAL}), apresentada no gráfico de Pareto (Figura 9), indicou que nenhuma das variáveis principais apresentou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) dentro da faixa experimental estudada. Esse resultado indica que, dentro da faixa experimental estudada, a recuperação da pectinase na fase rica em sal não foi influenciada de forma isolada e significativa pelas variáveis principais, como massa molar do PEG, concentração de PEG, concentração de sal ou pH.

Na análise do diagrama de Pareto para a recuperação da pectinase na fase rica em sal, observou-se que apenas a interação entre os fatores MM_{PEG} e pH apresentou significância estatística ($p < 0,05$). Essa interação foi a única capaz de influenciar de forma relevante a recuperação da enzima na fase inferior do sistema, evidenciando que a partição da pectinase na fase salina depende principalmente do efeito combinado dessas duas variáveis.

Figura 9. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da pectinase na fase sal.



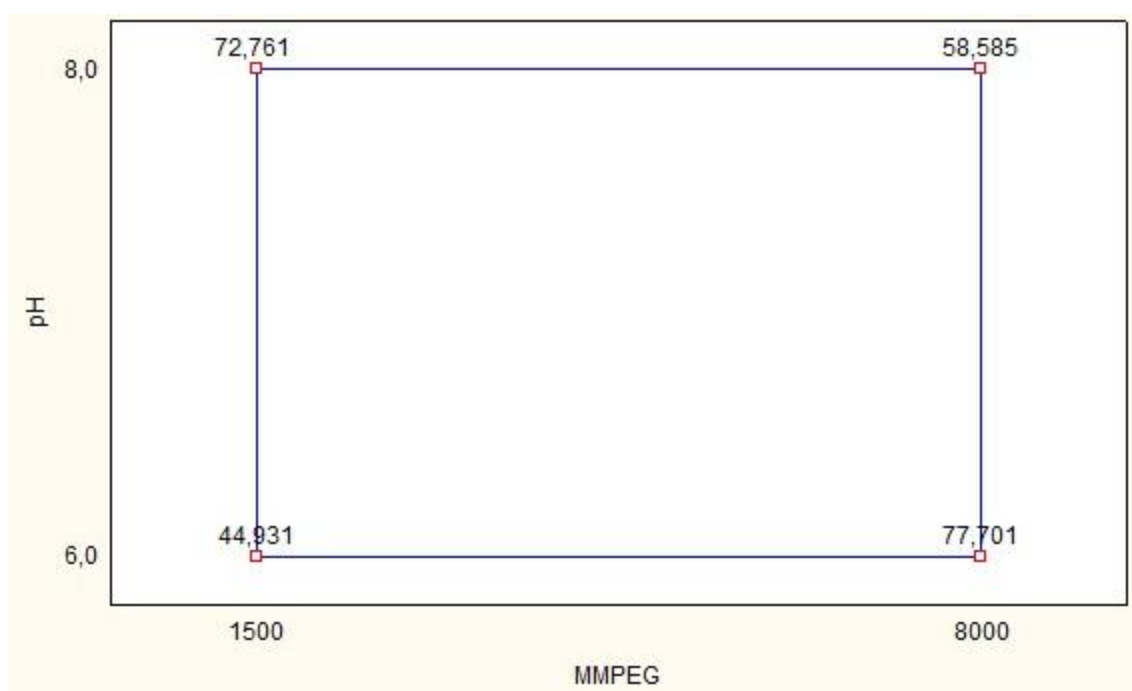
MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG; C_{sal} – Concentração de sal; C_{PEG} – Concentração do polietilenoglicol, pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

Esse resultado indica que, embora os efeitos isolados do MM_{PEG} ou do pH não tenham sido suficientes para provocar alterações expressivas na recuperação enzimática, a combinação simultânea desses parâmetros exerce papel determinante no comportamento da enzima dentro do sistema. Do ponto de vista físico-químico, essa interação pode estar relacionada ao fato de que o aumento da massa molar do PEG modifica propriedades importantes da fase superior, como o volume excluído e a hidrofobicidade, enquanto o pH influencia diretamente a carga superficial, a solubilidade e a conformação da pectinase. Dessa forma, determinadas combinações entre MM_{PEG} e pH alteram a afinidade da proteína pelas fases do sistema, interferindo na sua distribuição.

Como já foi mencionado, o efeito observado para essa interação foi negativo, indicando que o aumento simultâneo do MM_{PEG} e do pH reduz a recuperação da pectinase na fase rica em sal, caracterizando um comportamento antagonista entre essas variáveis. Essa tendência é claramente evidenciada no gráfico de interação (Figura 10), no qual se observa que, em pH mais elevado (8,0), o aumento do MM_{PEG} de 1500 para

8000 g/mol resulta em uma diminuição da recuperação enzimática (de 72,76 para 58,58). Em contraste, em pH 6,0, a recuperação aumenta significativamente com o uso de PEG de maior massa molar, atingindo o maior valor experimental observado (77,70). Esses resultados confirmam que o efeito da massa molar do polímero não é independente, mas condicionado pelo pH do meio, reforçando o caráter interativo e não linear da partição proteica em sistemas de duas fases aquosas.

Figura 10. Gráfico de interação entre a pH e MM_{PEG} na recuperação da pectinase na fase sal.



MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG e pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

De acordo com Albertsson (1986), a distribuição de proteínas no SDEA é fortemente influenciada por fatores combinados, como o tamanho do polímero e o estado de ionização da biomolécula, os quais alteram simultaneamente a hidrofobicidade relativa das fases e as interações eletrostáticas envolvidas. Assim, a significância dessa interação demonstra que a recuperação da pectinase na fase salina não é controlada apenas por efeitos individuais, mas principalmente pelo ajuste conjunto entre a massa molar do PEG e o pH do sistema. Em determinadas condições, essa combinação pode favorecer a migração da enzima para a fase superior rica em PEG ou para a interface, devido às modificações na afinidade da proteína provocadas por mudanças na polaridade do meio e no seu estado de carga, tornando essa interação um

ponto crítico para otimizações futuras quando o objetivo é direcionar a enzima para a fase inferior.

Estudos como o de Antov *et al.* (2004) também evidenciam a aplicabilidade de SDFA na extração de enzimas pectinolíticas. Os autores empregaram sistemas PEG 4000 g/mol - sulfato de amônio e observaram rendimentos de 72,41% e 69,46% para endo- e exo-poligalacturonase, respectivamente, reforçando que a recuperação enzimática pode variar amplamente conforme o tipo de sistema e as condições operacionais empregadas.

3.4.3 Análise do fator de purificação (*FP*) como indicador da eficiência de purificação da pectinase

O fator de purificação (*FP*) é um parâmetro fundamental para avaliar a eficiência do sistema de duas fases aquosas como etapa de purificação parcial, pois expressa o grau de enriquecimento da pectinase em determinada fase após a partição. Diferentemente da recuperação, que indica a quantidade de atividade enzimática retida, o *FP* reflete diretamente a seletividade do sistema em concentrar a enzima em relação às demais proteínas presentes no extrato bruto.

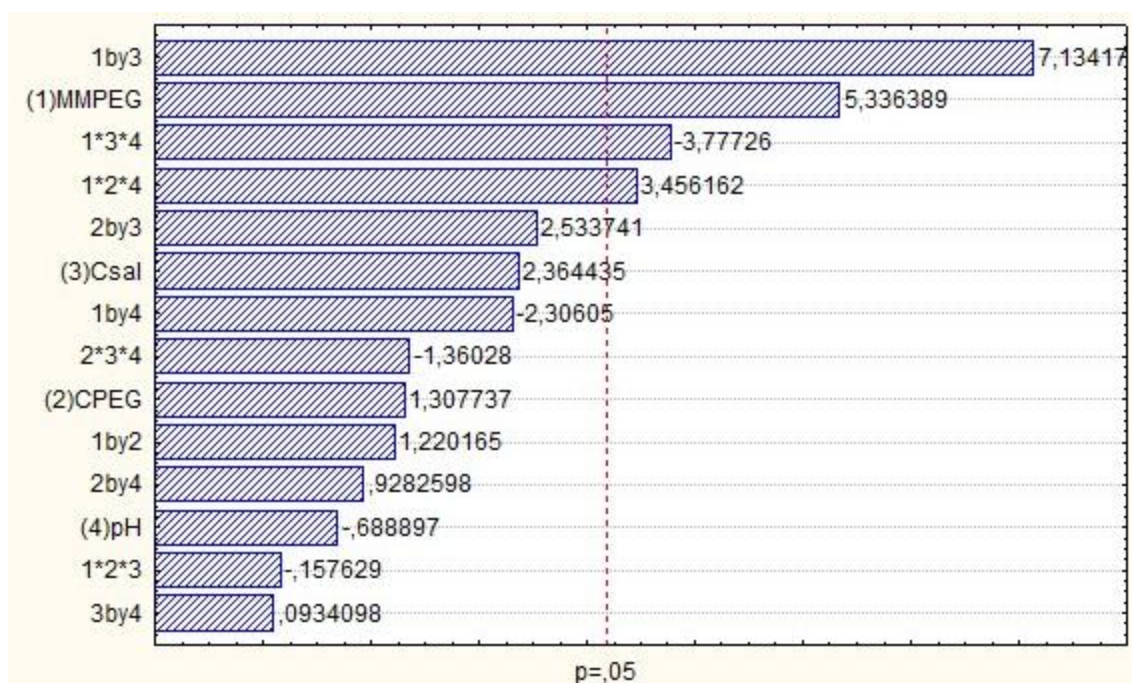
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, destacam-se dois ensaios que demonstraram os maiores fatores de purificação obtidos no estudo, evidenciando condições promissoras para o fracionamento da pectinase. No ensaio 6, observou-se o maior valor de *FP* na fase superior rica em PEG ($FP_{PEG}=1,00$), indicando que, sob essas condições experimentais, o sistema favoreceu a purificação da enzima nessa fase. Por outro lado, o ensaio 15 apresentou o maior fator de purificação na fase inferior rica em sal ($FP_{SAL}=1,85$), sugerindo uma condição em que a pectinase foi mais seletivamente concentrada na fase salina.

Esses resultados reforçam que, além da migração preferencial da enzima entre as fases, o sistema pode promover diferentes níveis de purificação dependendo da combinação das variáveis físico-químicas empregadas. Assim, a identificação dessas condições de maior *FP* é particularmente relevante, pois demonstra o potencial do SDFA como uma estratégia inicial de purificação da pectinase, permitindo direcionar o processo para a fase que maximize o enriquecimento enzimático.

Dessa forma, a fim de compreender quais variáveis exerceram maior influência sobre o fator de purificação nas fases PEG e sal, foram construídos diagramas de Pareto para FP_{PEG} e FP_{SAL} , os quais são discutidos a seguir.

O diagrama de Pareto (Figura 11) construído para o fator de purificação da pectinase na fase superior rica em PEG (FP_{PEG}) evidência quais variáveis exerceram maior influência sobre o enriquecimento enzimático nessa fase. Observa-se que apenas os termos que ultrapassam a linha de significância estatística ($p < 0,05$) apresentaram efeito relevante sobre o FP_{PEG} .

Figura 11. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o fator de purificação da pectinase na fase PEG (FP_{PEG}).

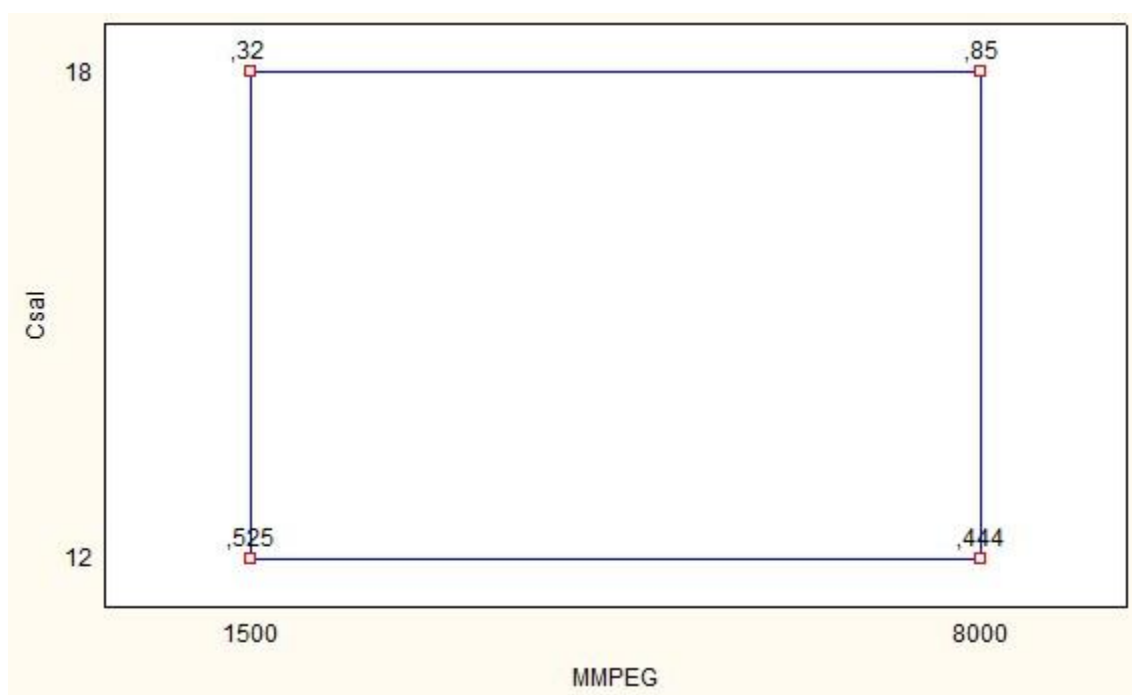


MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG; C_{sal} – Concentração de sal; C_{PEG} – Concentração do polietilenoglicol, pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

Nesse contexto, a interação $MM_{PEG} \times C_{Sal}$ foi o fator mais significativo e com efeito positivo, indicando que a combinação entre a massa molar do PEG e a concentração de sal desempenha papel determinante no aumento do FP_{PEG} . Esse resultado sugere que ajustes simultâneos nesses parâmetros podem favorecer a seletividade do sistema, promovendo maior concentração relativa da pectinase em relação às demais proteínas presentes no extrato.

Conforme evidenciado no gráfico de interação (Figura 12), observa-se que o aumento da massa molar do PEG (MM_{PEG}), associado a maiores concentrações de sal (C_{SAL}), promove um incremento significativo no fator de purificação (FP) da pectinase na fase superior rica em PEG. Esse comportamento pode ser explicado pelo efeito de exclusão estérica causado por PEGs de maior massa molar, os quais reduzem o volume disponível para a proteína na fase polimérica, favorecendo a migração seletiva de determinadas biomoléculas.

Figura 12. Gráfico de interação entre a C_{SAL} e MM_{PEG} sobre o fator de purificação da pectinase na fase PEG (FP_{PEG}).



MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG e C_{Sal} – Concentração de sal.

Além disso, o aumento da concentração salina intensifica a força iônica do sistema, contribuindo para o fenômeno de *salting-out*, que diminui a solubilidade de proteínas na fase salina e favorece sua partição para a fase PEG. Dessa forma, a combinação entre MM_{PEG} elevada e C_{SAL} aumentada potencializa interações hidrofóbicas e diferenciais de afinidade, resultando em maior concentração da pectinase na fase superior e, conseqüentemente, em melhores valores de fator de purificação.

O efeito principal da MM_{PEG} também se mostrou estatisticamente significativo, reforçando que o tamanho do polímero influencia diretamente a eficiência de purificação. PEGs de maior massa molar alteram propriedades como volume excluído e

hidrofobicidade da fase superior, podendo favorecer a partição seletiva da enzima e, consequentemente, aumentar o fator de purificação.

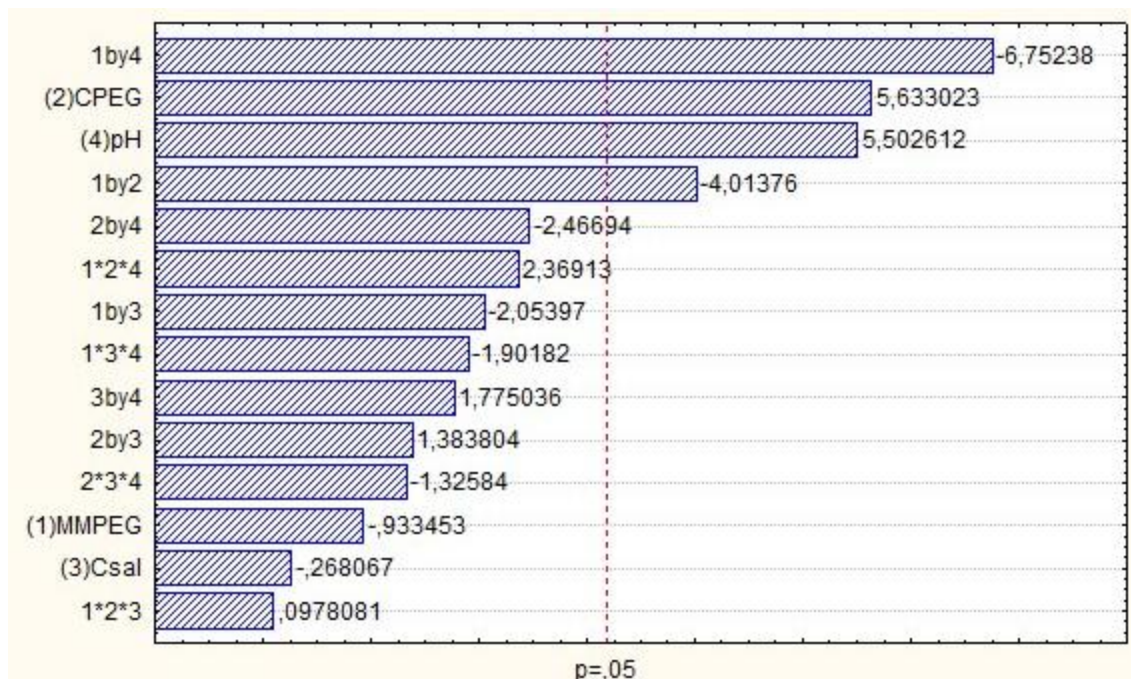
Entre os demais termos significativos, destacam-se ainda as interações $1 \times 3 \times 4$ e $1 \times 2 \times 4$, indicando que o efeito do MM_{PEG} sobre o FP_{PEG} pode ser modulado pela concentração de sal, pela concentração de PEG e pelo pH do sistema. Esses resultados confirmam que o fator de purificação não depende apenas de variáveis isoladas, mas do equilíbrio entre múltiplos parâmetros físico-químicos que controlam as interações proteína-polímero e proteína-sal no SDFA.

Portanto, o Pareto para FP_{PEG} demonstra que o aumento do fator de purificação na fase PEG está fortemente associado principalmente à massa molar do polímero e à sua interação com a concentração salina, evidenciando a importância de estratégias multifatoriais para melhorar a condição de purificação parcial da pectinase nessa fase.

Já o diagrama de Pareto do fator de purificação da pectinase na fase inferior rica em sal (FP_{SAL}) (Figura 13) mostra que as variáveis individuais C_{PEG} e pH foram as que mais influenciaram na purificação da enzima. Os resultados revelam que a eficiência do processo é regida por uma complexa interação entre as propriedades poliméricas e as condições eletrostáticas do meio. O efeito de maior magnitude observado foi a interação entre a MM_{PEG} e o pH, com um valor negativo expressivo de -6,75. Este resultado indica um efeito sinérgico negativo: para se obter uma purificação superior, o uso de PEGs de maior massa molar deve ser associado a valores de pH mais baixos, ou vice-versa. Fisicamente, isso sugere que o aumento do tamanho da cadeia polimérica (maior exclusão estérica) somado a alterações na carga líquida da enzima (promovidas pelo pH) pode causar uma precipitação ou uma partição desfavorável se ambos estiverem em níveis elevados simultaneamente.

Individualmente, a C_{PEG} e o pH apresentaram os maiores efeitos positivos significativos (5,63 e 5,50, respectivamente). O efeito positivo da concentração de PEG corrobora a teoria do volume excluído, onde o aumento do polímero na fase superior "empurra" a pectinase para a fase salina, aumentando sua concentração relativa e, consequentemente, o fator de purificação. Já a relevância do pH se deve ao fato de a pectinase ser uma macromolécula anfótera; o ajuste do pH afeta seu ponto isoelétrico e sua hidrofobicidade superficial, modulando a afinidade da enzima pela fase salina.

Figura 13. Gráfico de pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o fator de purificação da pectinase na fase sal (FP_{Sal}).



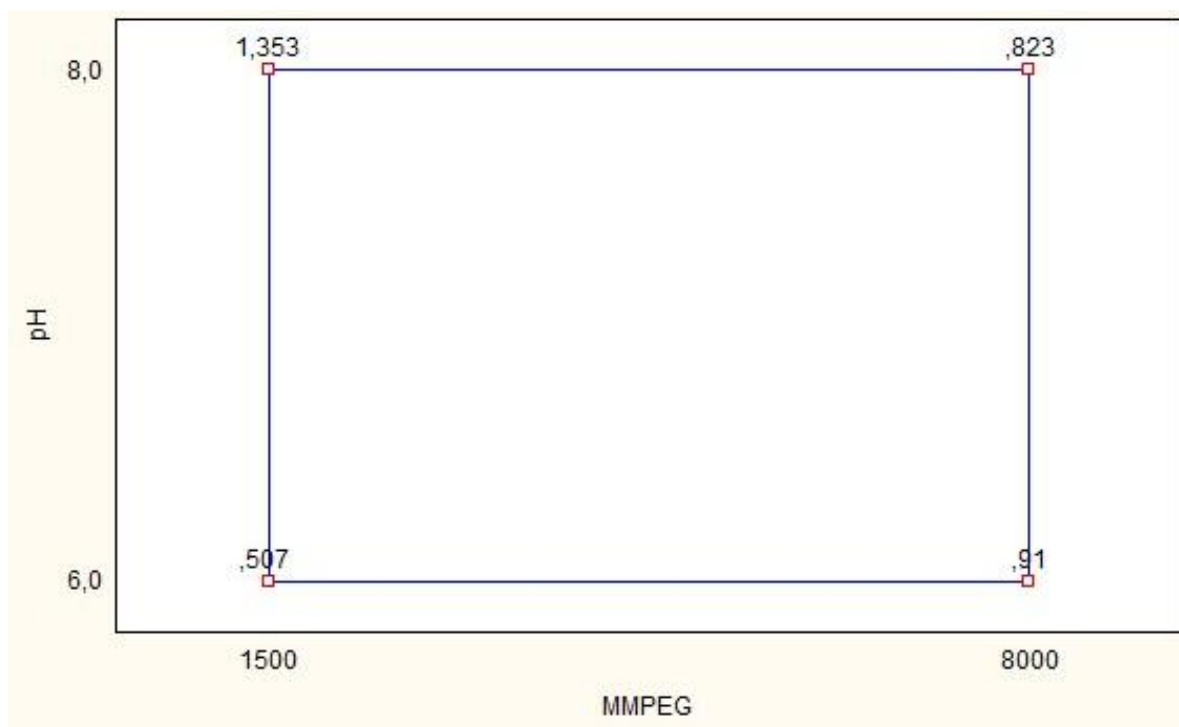
MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG; C_{sal} – Concentração de sal; C_{PEG} – Concentração do polietilenoglicol, pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

Em contrapartida, a MM_{PEG} e a C_{sal} , quando analisadas isoladamente, não ultrapassaram o limite de significância estatística. Isso indica que, dentro das faixas experimentais testadas, a simples troca da massa molar do polímero ou a variação da densidade salina não são os motores principais da purificação, a menos que atuem em conjunto com outras variáveis. Portanto, para a otimização deste sistema, deve-se priorizar o controle rigoroso da interação entre o tamanho do polímero e o pH, além de manter concentrações elevadas de PEG para maximizar a recuperação da enzima na fase inferior.

A análise do gráfico de interação entre a MM_{PEG} e o pH (Figura 14) confirma a forte dependência mútua dessas variáveis sobre o FP_{Sal} . Observou-se que o valor máximo de purificação (1,35) foi obtido no nível inferior de MM_{PEG} (1500 g/mol) e nível superior de pH (8,0). Essa configuração sugere que, em pH mais elevado, a pectinase apresenta maior afinidade pela fase salina, e a utilização de um polímero de menor cadeia reduz a exclusão estérica excessiva, facilitando a partição seletiva da enzima. Por outro lado, o incremento da massa molar para 8000 em pH 8,0 resultou em uma redução drástica na purificação, reforçando que a combinação de cadeias longas de

PEG com variações na carga superficial da proteína (induzidas pelo pH) pode limitar a eficiência da purificação nesta fase.

Figura 14. Gráfico de interação entre a C_{Sal} e MM_{PEG} sobre o fator de purificação da pectinase na fase Sal (FP_{Sal}).



MM_{PEG} – Massa molar do polietilenoglicol – PEG e pH – Valor do potencial hidrogeniônico.

Em relação ao balanço de massa (BM) observado na Tabela 6, a maioria dos ensaios apresentou valores satisfatórios, próximos ou superiores a 70%, indicando boa recuperação do material enzimático no sistema. Os maiores valores de BM foram observados nos ensaios 6, 9 e 15 (102,25%, 108,42% e 108,16%, respectivamente), sugerindo maior eficiência global do SDFA.

A importância do BM em SDFA está relacionada ao fato de que esse parâmetro permite avaliar a conservação da atividade enzimática durante o processo de partição, funcionando como um indicador da confiabilidade experimental. Valores próximos de 100% sugerem que a pectinase foi adequadamente recuperada nas fases formadas, sem perdas significativas por desnaturação, precipitação, adsorção na interface ou retenção em resíduos do sistema. Dessa forma, um BM satisfatório reforça a viabilidade do SDFA como estratégia de purificação parcial, assegurando que os resultados de

recuperação e fator de purificação refletem de maneira consistente o comportamento da enzima no processo.

Além disso, valores ligeiramente superiores a 100%, como os observados em alguns ensaios, podem estar associados a variações experimentais e limitações analíticas na determinação da atividade, sendo frequentemente reportados em sistemas complexos contendo extratos brutos. Assim, o balanço de massa constitui um parâmetro essencial para validar a eficiência e a estabilidade do sistema de purificação proposto.

Diante dos resultados obtidos, o ensaio selecionado como condição mais adequada para a purificação da pectinase foi o ensaio 15, conduzido com MM_{PEG} de 1500 g/mol, 17% de C_{PEG} , 18% de C_{SAL} e pH 8. Nessa condição, observou-se um coeficiente de partição inferior a 1 ($K=0,82$), indicando a migração preferencial da enzima para a fase inferior rica em sal. Além disso, o ensaio apresentou elevada recuperação na fase salina ($Y_{SAL}=93,35\%$), o maior fator de purificação obtido nessa fase ($FP_{SAL}=1,85$) e um balanço de massa satisfatório ($BM=108,16\%$), demonstrando boa eficiência global do sistema.

A escolha dessa condição é particularmente vantajosa, uma vez que a concentração da enzima na fase salina representa uma alternativa mais apropriada para aplicações industriais, especialmente no contexto de aditivos destinados à nutrição animal. Isso ocorre porque a fase rica em sal tende a ser mais compatível e economicamente favorável do que a fase polimérica contendo polietilenoglicol (PEG), reduzindo etapas adicionais de remoção de polímero e facilitando a incorporação do produto enzimático em formulações de ração.

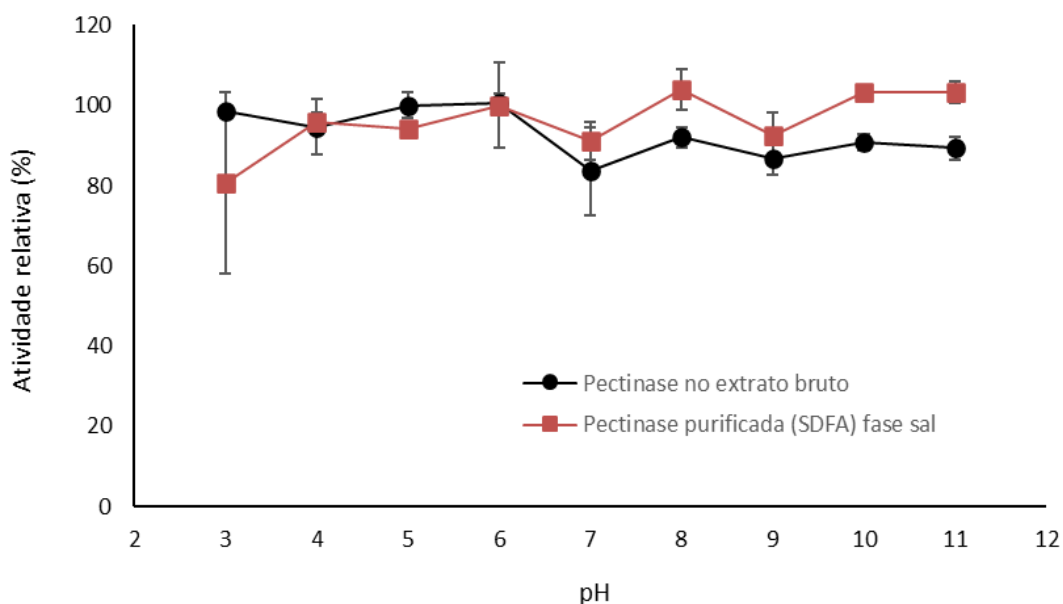
3.5 Caracterização bioquímica da pectinase

A caracterização bioquímica da pectinase desenvolvida neste trabalho foi realizada utilizando duas preparações enzimáticas: o extrato bruto proveniente do processo fermentativo e a fração enzimática obtida após a purificação pelo SDFA. Para a etapa de purificação, foi considerada a condição selecionada no ensaio 15, na qual a enzima foi concentrada na fase inferior rica em sal. Dessa forma, todas as análises subsequentes foram conduzidas de modo comparativo, permitindo avaliar as propriedades catalíticas da pectinase antes e após o processo de purificação, bem como o impacto do SDFA sobre o potencial de aplicação da enzima.

3.5.1 Efeito do pH na atividade da pectinase

Na Figura 15, é apresentado o efeito do pH sobre a atividade da pectinase produzida por *Trichoderma orientale* (UFPI18), cultivado em casca de limão. O gráfico expressa a atividade residual (%) da enzima em função do pH, permitindo identificar a faixa de atuação e o comportamento catalítico da pectinase sob diferentes condições de acidez e alcalinidade. Essa análise foi realizada tanto para a enzima presente no extrato bruto quanto para a pectinase purificada pelo sistema de duas fases aquosas (SDFA), obtida a partir da fase inferior rica em sal. Observa-se que o ponto ótimo de atuação da enzima no extrato bruto foi registrado em pH 5 e 6 com valores de atividade próximos de 100%. A partir de pH neutro (pH 7,0), observou-se redução significativa da atividade, caindo para aproximadamente 80–85%, e mantendo-se relativamente estável, porém abaixo do máximo, em pH 8 e 11. Esse comportamento sugere menor afinidade catalítica ou estabilidade da pectinase presente no extrato bruto em ambientes neutros e alcalinos.

Figura 15. Efeito do pH da pectinase produzidas por *Trichoderma orientale* (UFPI18) crescido em casca de limão.



A enzima purificada pelo SDFA (fase salina) exibiu perfil semelhante em pH levemente ácido, com atividade próxima de 100% em pH 5 e 6. Porém o pH máximo de atuação da pectinase purificada foi registrado em pH 8 (neutro e alcalino), com 100% de atividade indicando maior eficiência catalítica da enzima em condições próximas à

neutralidade. Sendo assim, os resultados demonstram que a pectinase apresenta melhor desempenho em condições neutras e alcalinas, enquanto sua atividade é relativamente menor em ambientes fortemente ácidos. Esse comportamento é compatível com o perfil de muitas enzimas produzidas por fungos filamentosos, que frequentemente exibem maior atividade em faixas de pH moderadas, reforçando o potencial de aplicação dessa pectinase em processos biotecnológicos e formulações industriais que operam próximo à neutralidade.

Resultados semelhantes têm sido relatados na literatura para pectinases de origem fúngica. Pagnonceli (2018), ao avaliar uma pectinase produzida por *Penicillium janthinellum* VI2R3M, observou atividade máxima em pH 5,0, com aproximadamente 80% de atividade residual. De forma comparável, Anand *et al.* (2017), estudando uma cepa de *Aspergillus niger* MTCC478, identificaram pH ótimo em torno de 4,0, além de ampla estabilidade enzimática em uma faixa de pH entre 3,0 e 11,0.

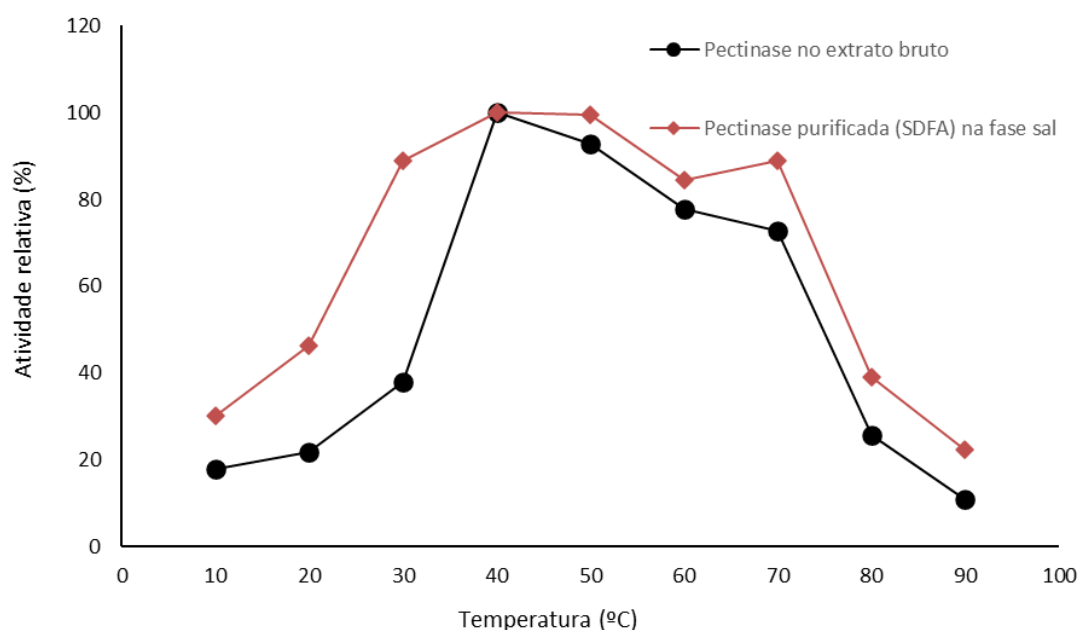
Santos *et al.* (2023) relatam que pectinase *Trichoderma asperellum* apresentou atividade ótima em pH 5,0, com significativa queda na faixa neutra, padrão semelhante ao exibido pelo extrato bruto avaliado neste trabalho. Liu *et al.* (2024) demonstraram que pectinases purificadas exibem maior estabilidade conformacional e maior amplitude de atividade em pH alcalino quando comparadas ao extrato bruto, sugerindo que a remoção de proteínas interferentes e íons competitivos pode preservar a estrutura ativa da enzima. Esses resultados corroboram diretamente o melhor desempenho observado na pectinase purificada via SDFA. Zhang *et al.* (2025) reforçam que sistemas de duas fases aquosas (como o SDFA) podem conferir maior resistência de estruturas proteicas a variações de pH, possivelmente por meio de estabilização da rede de ligações hidrofóbicas e eletrostáticas.

3.5.2 Efeito da temperatura na atividade da pectinase

A caracterização do efeito da temperatura sobre a atividade da relativa revelou que a pectinase produzida pelo *Trichoderma orientale* (UFPI18) presente no extrato bruto apresentou temperatura de 40°C e a enzima purificada (fase sal pelo SDFA) apresentou temperatura de 50°C (Figura 16). Este resultado é condizente com o comportamento descrito por Nsude *et al.* (2022) para a pectinase de *Trichoderma longibrachiatum* MT321074, que também registrou atividade máxima nesta mesma temperatura, mantendo uma retenção de 87% a 92% entre 30°C e 40°C. No presente

estudo, observa-se que a enzima purificada demonstrou uma estabilidade térmica superior à do extrato bruto; enquanto o extrato bruto apresentou uma queda acentuada de atividade em temperaturas mais baixas (30°C), a forma purificada manteve cerca de 90% de sua capacidade catalítica nesta faixa, sugerindo que o processo de purificação favoreceu a manutenção da conformação ativa da proteína.

Figura 16. Efeito da temperatura da pectinase produzida por *Trichoderma orientale* crescido em casca de limão.



Ao atingir temperaturas mais elevadas, nota-se que a enzima purificada preservou 100% de sua atividade relativa até os 50°C, superando levemente os achados de Anand *et al.* (2017) para *Aspergillus niger* MTCC478, onde a estabilidade máxima da pectinase foi observada apenas até os 40°C. Esse perfil de "planalto" na atividade entre 40°C e 50°C assemelha-se ao padrão relatado por Jalil & Ibrahim (2021), que identificaram um ótimo de 50°C com manutenção de 90-95% da atividade da pectinase em faixas adjacentes (45°C e 55°C).

Entretanto, acima de 60 °C, ambas as enzimas (bruta e purificada) apresentaram um declínio drástico na atividade relativa, chegando a valores próximos de 10% a 90°C no extrato bruto. Esse fenômeno é explicado por Meena *et al.* (2015), que afirmam que a desnaturação térmica da enzima em temperaturas elevadas compromete a integridade do sítio ativo, reduzindo rapidamente a velocidade da reação. O padrão de inativação

observado — com quedas acentuadas após os 70°C — estabelece um perfil de estabilidade muito próximo ao de outras espécies de *Trichoderma*, como o *T. orientale*, confirmando que a pectinase em questão possui uma janela operacional robusta em temperaturas moderadas, mas é sensível ao estresse quando a temperatura é elevada.

3.5.3 Efeito de íons sobre a atividade da pectinase

A influência de diferentes íons na atividade da pectinase de *Trichoderma orientale* revelou perfis distintos entre o extrato bruto e a enzima purificada por SDFA (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito de diferentes íons na atividade da pectinase presente no extrato bruto de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão e da enzima purificada por sistema de duas fases aquosas (SDFA), extraída da fase rica em sal.

Íons	Atividade relativa da pectinase no extrato bruto (%)	Atividade relativa da pectinase purificada pelo SDFA (%)
Controle	100,00 ± 0,049	100,00 ± 0,078
Ferro	97,86 ± 0,013	85,07 ± 0,048
Sódio	101,29 ± 0,025	86,29 ± 0,074
Zinco	108,72 ± 0,013	96,93 ± 0,012
Magnésio	113,27 ± 0,046	95,29 ± 0,047
Cobre	91,17 ± 0,020	84,45 ± 1,256
Manganês	86,07 ± 0,028	80,36 ± 0,985
Potássio	90,15 ± 0,002	78,73 ± 0,147
Alumínio	88,20 ± 0,027	82,61 ± 0,478
Cobalto	107,70 ± 0,005	99,59 ± 0,587
Bário	63,13 ± 0,0234	54,19 ± 0,962

No extrato bruto, observou-se um efeito ativador significativo na presença de Magnésio (113,27% ± 0,046), Zinco (108,72% ± 0,013), Cobalto (107,70% ± 0,005) e Sódio (101,29±0,025), indicando que esses íons podem atuar como cofatores que melhorem a catálise. Por outro lado, a enzima purificada apresentou uma tendência geral de redução da atividade na presença da maioria dos íons testados quando comparada ao seu próprio controle (atividade enzimática na ausência de íons), com exceção do Cobalto (99,59% ± 0,587), que praticamente manteve a atividade original. Esse resultado sugere que o cobalto não interfere negativamente na conformação

estrutural ou no mecanismo catalítico da pectinase, podendo até atuar como um possível cofator estabilizante ou apresentar interação neutra com a enzima.

O íon Bário atuou como um forte inibidor para ambas as formas, reduzindo a atividade para 63,13% no bruto e 54,19% na purificada, representando a maior queda observada no estudo. Os resultados de ativação pelo Mg^{2+} no extrato bruto corroboram os achados de Oumer & Abate (2017), que registraram atividades de até 136,7% na presença deste íon. No entanto, o comportamento divergente entre o extrato bruto e a enzima purificada — onde a enzima purificada não apresentou o mesmo aumento de atividade — reforça as observações de Amande *et al.* (2013), onde estes autores destacam que diferentes tipos de pectinases e o estado de pureza da amostra respondem de forma distinta aos mesmos íons; em seu estudo utilizando também uma linhagem de *Trichoderma*, íons como Na^+ e Zn^{2+} atuaram como ativadores, enquanto o Mg^{2+} causou inibição, padrão que ecoa a sensibilidade demonstrada pela nossa enzima purificada.

A redução da atividade da pectinase purificada pelo SDFA presença de Alumínio (82,61%) e Manganês (80,36%) também encontra suporte na literatura. Jalil & Ibrahim (2021), estudando *Aspergillus niger* LFP-1, relataram que a atividade da pectinase foi significativamente reduzida por Mn^{2+} , Al^{3+} e Ba^+ , sendo este último o inibidor mais severo, assim como verificado nesta análise. Em contraste, enquanto Anand *et al.* (2017) observaram que o Cobre aumentou a atividade em 148%, no presente trabalho este íon atuou como um inibidor moderado para ambas as fases 91,17% e 84,45%, sugerindo que a pectinase de *Trichoderma orientale* possui características estruturais específicas em seu sítio ativo. O efeito desses íons metálicos pode ser compreendido por diferentes mecanismos bioquímicos.

De acordo com Oumer & Abate (2017) e Pedrolli & Carmona (2014), íons ativadores como Mg^{2+} e Co^{2+} podem estabilizar a conformação da enzima ou facilitar a formação do complexo enzima-substrato ao neutralizar cargas negativas da pectina. Já a inibição causada por íons como Ba^{2+} e Cu^{2+} pode decorrer da competição por sítios de ligação de cofatores essenciais ou da interação com grupos sulfidríla de aminoácidos fundamentais, resultando em mudanças conformacionais desfavoráveis que comprometem a integridade do sítio catalítico. A maior sensibilidade da enzima purificada aos íons, em comparação ao extrato bruto, pode estar relacionada à ausência

de outras proteínas e compostos interferentes que, no extrato bruto, poderiam exercer um efeito protetor ou quelante sobre esses minerais.

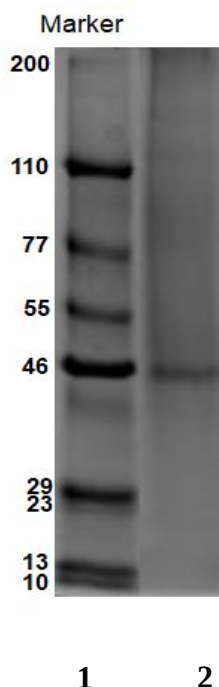
Considerando a potencial aplicação biotecnológica desta enzima como aditivo em rações para frangos de corte, os resultados de ativação por Mg^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} são promissores. Estes minerais são componentes rotineiros em dietas avícolas para suporte metabólico e imunológico. A manutenção ou incremento da atividade enzimática na presença desses íons sugere que a pectinase de *T. orientale* preservaria sua eficácia catalítica após a ingestão, auxiliando na degradação de fibras antinutricionais no lúmen intestinal, mesmo em dietas suplementadas com premixes minerais.

3.6 Perfil eletroforético da pectinase obtido por SDS-PAGE

O SDS-PAGE foi empregado para verificar a pureza da enzima. Na Figura 17 demonstra que a massa molecular da enzima pectinolítica do *Trichoderma orientale* foi encontrada com 46,0kDa. Bhattacharyya *et al.* (2021), encontraram massa molecular de 47,0kDa para pectinase de *Aspergillus terreus* FP6, valor próximo ao encontrado no presente estudo. Jalil *et al.* (2021) purificaram pectinase de *Aspergillus niger* crescido em cascas de pomelo (resíduo cítrico semelhante à casca de limão) obtiveram massa molecular de 48kDa, apenas 2,0kDa superior ao valor apresentado para pectinase de *Trichoderma orientale*, revelando que enzimas pectinolíticas produzidas com esses substratos apresentam massa molecular conservada na faixa de 46-48,0 kDa.

Anand *et al.* (2016) purificaram endo-poligalacturonase de *Aspergillus fumigatus* obtiveram massa molecular de 43,0kDa, valor 3,0kDa inferior ao presente estudo, porém dentro da variação natural observada entre espécies fúngicas distintas. A massa molecular de 46,0kDa observada situa-se exatamente na faixa modal (43-48 kDa) relatada para endo-poligalacturonases fúngicas, diferindo significativamente da pectinase de *Trichoderma harzianum* relatada por Valsangiacomo *et al.* (1992) com 90,5kDa, indicando que diferentes espécies de *Trichoderma* produzem isoenzimas pectinolíticas com massas moleculares distintas.

Figura 17. Determinação da massa molecular da enzima pectinolítica utilizando SDS-PAGE.



1 – Marcador; 2 – Amostra purificada da fase inferior do sistema bifásico (fase rica em sal).

Enzimas pécticas, com exceção da exoPG, apresentaram peso molecular entre 30 e 50,0 kDa; no entanto, a análise por SDS-PAGE da endoPG de *Bispora* sp. MEY-1 e *Stereum purpureum* GH28 e da PME isolada de *Aspergillus repens* expressou massa molecular de 71, 60 e 141,0kDa, respectivamente (Arotupin *et al.*, 2008; Carli *et al.*, 2019). Kant *et al.* (2013) encontraram um peso de 106,0 kDa de exo-PG em PAGE nativo, que após análise SDS-PAGE mostrou a existência de duas subunidades de 69 e 34 kDa. Assim, a caracterização por SDS-PAGE confirma que a pectinase de *Trichoderma orientale* (UFPI 18) é proteína monomérica de 46,0kDa com alto grau de pureza, estruturalmente compatível com endo-poligalacturonases de fungos filamentosos.

3.7 Determinação da eficiência catalítica da pectinase (K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e k_{cat}) e parâmetros termodinâmicos da reação

A caracterização cinética da pectinase foi realizada com o objetivo de avaliar a afinidade pelo substrato e a eficiência catalítica da enzima, tanto no extrato bruto quanto

após purificação pelo sistema de duas fases aquosas (SDFA), fase salina. Os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$, K_m e k_{cat} foram determinados a partir da velocidade inicial da reação em diferentes concentrações de substrato, ajustadas ao modelo de Michaelis-Menten.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8. No extrato bruto, a pectinase apresentou $V_{m\acute{a}x}$ de 0,48 U/mL, K_m de 0,097 mg/mL e k_{cat} de 1,13 s⁻¹, indicando alta afinidade pelo substrato e eficiência catalítica moderada. Após purificação pelo SDFA, na fase salina, a enzima apresentou $V_{m\acute{a}x}$ de 0,281 U/mL, K_m de 0,26 mg/mL e k_{cat} de 2,89 s⁻¹.

A análise comparativa demonstra um comportamento interessante: embora a $V_{m\acute{a}x}$ da pectinase purificada tenha diminuído em relação ao extrato bruto, o k_{cat} apresentou aumento significativo, sugerindo que cada molécula da enzima purificada é mais eficiente na conversão do substrato em produto. Isso pode ser explicado pelo fato de que a purificação removeu proteínas concorrentes e cofatores inibidores presentes no extrato bruto, concentrando a enzima ativa e aumentando sua capacidade catalítica por molécula.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos da reação catalisada pela pectinase presente no extrato bruto e purificada pelo SDFA.

Parâmetros cinéticos	Pectinase no extrato bruto	Pectinase extraída pelo SDFA
K_m (mg/mL)	0,09	0,26
$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	0,48	0,28
k_{cat} (s ⁻¹)	1,13	2,89
k_{cat}/K_m (mL/mg.s)	11,69	10,95

Por outro lado, o aumento do K_m na enzima purificada indica menor afinidade pelo substrato em comparação ao extrato bruto, o que sugere que a remoção de componentes do extrato original afetou interações sinérgicas ou estabilizantes da enzima. Assim, embora cada molécula da enzima purificada seja mais eficiente (maior k_{cat}), é necessária uma concentração maior de substrato para atingir metade da velocidade máxima.

Esses resultados evidenciam que a purificação pelo SDFA altera significativamente os parâmetros cinéticos da pectinase, promovendo maior eficiência molecular, mas reduzindo a velocidade máxima aparente e a afinidade global pelo

substrato. Tal comportamento é relevante para aplicações industriais, onde a escolha entre extrato bruto ou enzima purificada depende do balanço entre atividade global e eficiência catalítica por molécula.

A redução da $V_{m\acute{a}x}$ após a purificação pode estar associada à perda parcial de cofatores ou à presença de formas enzimáticas menos ativas removidas durante o processo de SDFA. Por outro lado, o aumento do K_m indica que a enzima purificada requer maior concentração de substrato para atingir metade de sua velocidade máxima, o que é compatível com alterações conformacionais ou remoção de componentes sinérgicos presentes no extrato bruto.

Comparativamente, o extrato bruto mostrou maior eficiência catalítica, o que é comum em sistemas enzimáticos ainda não purificados, onde proteínas auxiliares e cofatores podem contribuir para a atividade global. A purificação, embora tenha concentrado a pectinase, alterou sua afinidade e velocidade máxima, evidenciando que os parâmetros cinéticos são sensíveis às condições do sistema e ao estado de pureza da enzima. Esses resultados indicam que a pectinase obtida de *Trichoderma orientale* apresenta boa atividade tanto no extrato bruto quanto após purificação, mas que a melhor condição do processo de purificação pode ser necessária para manter a eficiência catalítica máxima da enzima.

A eficiência catalítica da pectinase foi avaliada pelo parâmetro k_{cat}/K_m , que combina a capacidade da enzima de converter substrato em produto (k_{cat}) com sua afinidade pelo substrato (K_m). No extrato bruto, o valor de k_{cat}/K_m foi de aproximadamente $11,69 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, enquanto na enzima purificada pelo SDFA o valor foi de $10,95 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Esses resultados indicam que, embora a purificação tenha aumentado a velocidade catalítica por molécula (k_{cat}), a afinidade pelo substrato diminuiu, resultando em uma ligeira redução da eficiência global da enzima.

Em termos práticos, isso significa que o extrato bruto é ligeiramente mais eficiente na conversão do substrato em produto em baixas concentrações, enquanto a enzima purificada apresenta maior potencial catalítico individual, sendo mais vantajosa quando o substrato está em concentrações mais elevadas. O parâmetro k_{cat}/K_m , portanto, fornece uma medida integrada da eficiência enzimática, refletindo simultaneamente afinidade e velocidade catalítica.

Os parâmetros cinéticos da pectinase indicam seu potencial como aditivo enzimático em rações animais. O extrato bruto apresentou K_m baixo (0,097 mg/mL) e k_{cat}/K_m elevado (11,69 mL·mg⁻¹·s⁻¹), o que demonstra alta afinidade pelo substrato e eficiência catalítica mesmo em baixas concentrações de pectina presentes nos ingredientes vegetais das rações. Isso sugere que a enzima pode melhorar a digestibilidade de fibras pectínicas, liberando açúcares fermentáveis e aumentando a absorção de nutrientes sem necessidade de altas doses. Já a pectinase purificada apresentou k_{cat} maior (2,896 s⁻¹) e K_m mais elevado (0,264 mg/mL), indicando que cada molécula da enzima converte substrato mais rapidamente, mas necessita de concentrações mais altas de pectina para atingir a atividade máxima.

Em termos práticos, isso significa que a purificada pode ser vantajosa em formulações mais concentradas ou em rações enriquecidas com fibras pectínicas, enquanto o extrato bruto seria eficiente em dietas padrão. Assim, a análise de k_{cat}/K_m e K_m permitem avaliar a relação entre concentração de enzima, eficiência catalítica e potencial efeito sobre a digestibilidade de fibras, auxiliando na escolha do formato mais adequado de aditivo enzimático para frangos, suínos ou outros animais monogástricos.

3.8 Análise termodinâmica da pectinase

A caracterização termodinâmica da pectinase permitiu avaliar a eficiência catalítica e a afinidade pelo substrato nas formas de extrato bruto e purificada pelo SDFA. A partir do parâmetro k_{cat}/K_m , a energia livre de ativação aparente ($\Delta G^\ddagger$) foi calculada, resultando em -6,60 kJ/mol para o extrato bruto e -6,41 kJ/mol para a enzima purificada, como podemos observar na Tabela 9 indicando que a formação do complexo enzima-substrato é termodinamicamente favorável em ambos os casos. A diferença de energia livre de ativação ($\Delta \Delta G^\ddagger = 0,19$ kJ/mol) sugere que a purificação não alterou significativamente a eficiência global da enzima, apesar das alterações observadas nos parâmetros cinéticos individuais.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação catalisada pela pectinase presente no extrato bruto e purificada pelo SDFA.

Parâmetros termodinâmicos da reação	Pectinase no extrato bruto	Pectinase extraída pelo SDFA
$\Delta G^\ddagger_{E-T}$	-6,60 kJ/mol	-6,41 kJ/mol
ΔG°_{E-T}	-6,24 kJ/mol	-3,57 kJ/mol

Diferença de energia livre de ativação ($\Delta\Delta G^\ddagger$)	0,19kJ/mol
--	------------

A energia livre padrão de afinidade (ΔG°), obtida a partir da constante de afinidade $K_a = 1/K_m$, mostrou que o extrato bruto apresenta maior afinidade pelo substrato ($\Delta G^\circ = -6,24$ kJ/mol) em comparação à forma purificada ($\Delta G^\circ = -3,57$ kJ/mol), compatível com o aumento do K_m após a purificação. Isso indica que, embora cada molécula da enzima purificada converta substrato mais rapidamente (kcat maior), é necessário maior substrato para atingir a atividade máxima.

Esses dados têm implicações importantes para a aplicação da pectinase em rações de frangos de corte. O extrato bruto, com alta afinidade e eficiência global, pode ser especialmente eficaz em dietas comerciais, onde a concentração de pectina nos ingredientes vegetais é relativamente baixa, melhorando a digestibilidade de fibras e a liberação de açúcares fermentáveis. Já a enzima purificada, com kcat elevado, pode ser vantajosa em formulações enriquecidas em fibras ou em situações em que a dose da enzima é controlada, garantindo maior eficiência catalítica por molécula. Assim, a análise termodinâmica fornece suporte para a escolha do formato enzimático mais adequado, permitindo melhorar o desempenho nutricional e o aproveitamento de nutrientes em dietas de frangos de corte.

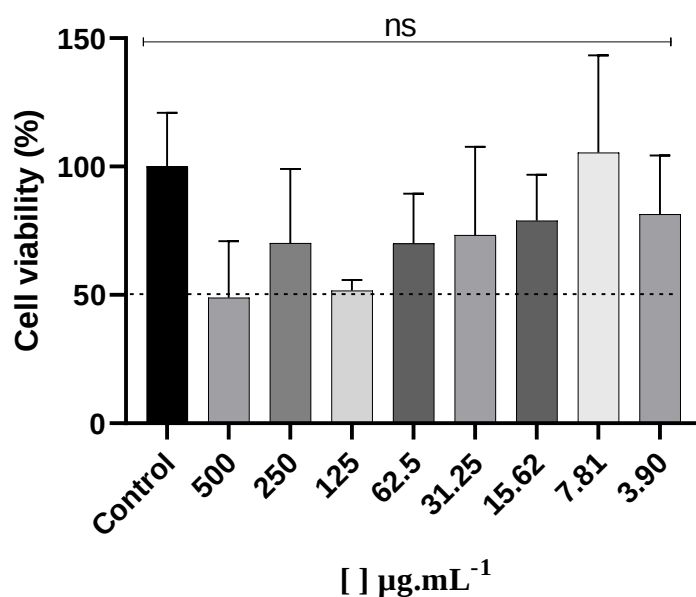
3.9 Avaliação de citotoxicidade da pectinase em células normais e tumorais

Os ensaios de citotoxicidade da pectinase frente à linhagem de fibroblastos L929 revelaram um perfil de viabilidade celular satisfatório em uma ampla faixa de concentrações (3,90 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), como pode ser observado na **Figura 18**.

Observou-se que, mesmo na maior concentração testada (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a viabilidade celular média permaneceu em torno de 50%, não atingindo níveis de toxicidade aguda severa. Conforme demonstrado no gráfico, as concentrações menores, especialmente entre 3,90 e 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram valores de viabilidade celular comparáveis aos do grupo controle, indicando que a enzima é bem tolerada pelas células em doses baixas e moderadas. A análise estatística indicou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$, indicado por "ns") entre as concentrações testadas e o controle negativo.

Este resultado é particularmente relevante, pois sugere que as variações observadas nas médias de viabilidade podem ser atribuídas a flutuações intrínsecas do ensaio biológico ou à variabilidade metabólica dos fibroblastos, e não necessariamente a um efeito citotóxico direto da pectinase. Sob a ótica da norma estabelecida pela International Organization for Standardization (ISO 10993-5), que estabelece o limiar de 70% de viabilidade para a classificação de materiais não citotóxicos, enquanto que valores entre 60% e 80% indicam leve citotoxicidade, a pectinase demonstra um perfil de segurança biológica adequado, especialmente nas concentrações inferiores a 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, onde a integridade celular foi amplamente preservada. Ou seja, os resultados obtidos com a pectinase sugerem ausência de citotoxicidade.

Figura 18. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929 expostos a diferentes concentrações de pectinase (3,90 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pelo ensaio de citotoxicidade. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão (n=3). ns: não significativo em relação ao controle (p > 0,05).

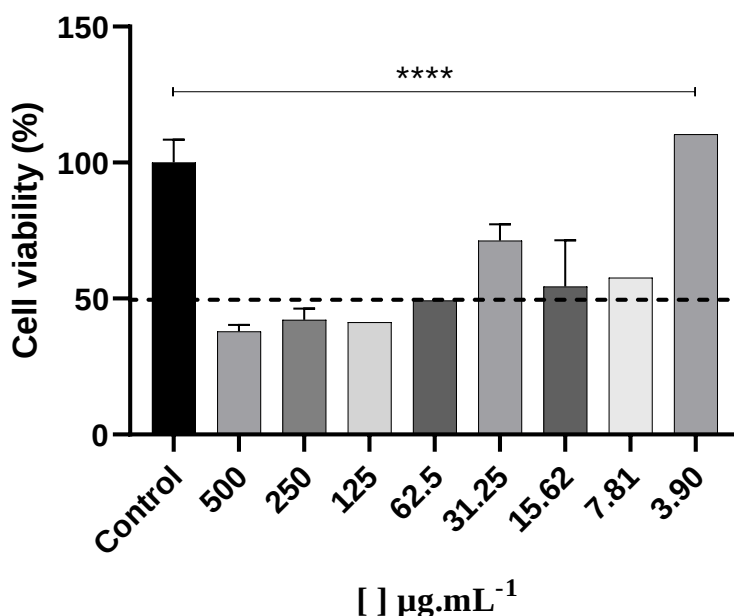


A manutenção da viabilidade acima de 50% em todas as faixas sugere que a pectinase não induz lise celular imediata ou interrupção crítica do metabolismo mitocondrial nas células L929. A ausência de um efeito dose-dependente linear — observada pela oscilação dos valores entre as concentrações intermediárias — reforça a hipótese de biocompatibilidade da enzima. Tais achados são promissores para a aplicação da pectinase em processos biotecnológicos ou biomédicos, uma vez que

fibroblastos são células sentinelas fundamentais na resposta tecidual, e sua resiliência à exposição enzimática corrobora o potencial de uso seguro deste composto em sistemas biológicos.

Os ensaios de citotoxicidade da pectinase frente à linhagem de adenocarcinoma mamário (MDA) revelaram um efeito inibitório marcante sobre a viabilidade celular, apresentando um perfil dose-dependente nas concentrações mais elevadas (**Figura 19**). Em contraste com o observado em linhagens não tumorais, a exposição das células MDA a concentrações entre 125 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ resultou em uma queda severa da viabilidade, que se estabeleceu abaixo do limiar de 50% (linha tracejada). A maior concentração testada $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduziu a sobrevivência celular para aproximadamente 40%, indicando um potencial antitumoral relevante da enzima nestas condições.

Figura 19. Avaliação da citotoxicidade da pectinase sobre a linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão da viabilidade celular (%) em concentrações de 3,90 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A linha tracejada indica o limiar de 50% de viabilidade. Os **** representa significância estatística de $p < 0,0001$ em relação ao controle.



A análise estatística corroborou a relevância dos dados, apresentando alta significância ($p < 0,0001$, indicado por ****) em comparação ao grupo controle. Observou-se que a viabilidade celular foi significativamente comprometida a partir da concentração de 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Podemos observar que apenas na menor concentração

testada 3,90µg.mL⁻¹, a viabilidade retornou a níveis equivalentes ou superiores aos do controle, sugerindo que existe um limiar crítico de concentração necessário para desencadear o efeito citotóxico nesta linhagem específica. A discussão desses resultados sugere que a pectinase possui uma ação seletiva mais acentuada contra células tumorais MDA do que contra fibroblastos normais.

Essa sensibilidade pode estar relacionada a diferenças na composição da membrana plasmática ou no metabolismo acelerado das células cancerígenas, que podem ser mais suscetíveis à degradação enzimática ou à indução de vias de morte celular por estresse. Enquanto a viabilidade nas células L929 manteve-se estável (não significativa), a queda estatisticamente robusta nas células MDA posiciona a pectinase como um agente de interesse para estudos de quimioterapia enzimática, onde o objetivo é maximizar o dano às células malignas preservando a integridade dos tecidos saudáveis circundantes.

Além disso, avaliações de biossegurança de enzimas microbianas destinadas a aplicações biotecnológicas indicam que preparações purificadas apresentam baixo impacto citotóxico em modelos celulares de mamíferos, desde que utilizadas dentro de faixas de concentração adequadas (Mahmoud *et al.*, 2025).

A demonstração de que a pectinase preserva a viabilidade de fibroblastos L929, aliada à sua atividade biológica seletiva observada em linhagens tumorais, forneceu o embasamento de biossegurança necessário para a progressão dos ensaios para modelos complexos *in vivo*. Esta transição baseou-se na premissa de que a enzima, ao manter a integridade de tecidos não tumorais, poderia atuar de forma segura no trato gastrointestinal de aves, visando à degradação de polissacarídeos não-amiláceos da dieta. Os resultados subsequentes da aplicação em frangos de corte confirmaram essa hipótese, demonstrando que a pectinase não apenas foi biocompatível, mas também atuou como um promotor de eficiência alimentar, reduzindo a viscosidade da digesta e melhorando a absorção de nutrientes, o que consolidou sua viabilidade técnica para o setor avícola em larga escala.

4 CONCLUSÕES

Dentre as linhagens avaliadas, *Trichoderma orientale* (UFPI 18) crescido em casca de limão demonstrou potencial na atividade de pectinase, obtendo resultados de condições do processo de produção dessa enzima.

A purificação por sistema de duas fases aquosas mostrou-se uma estratégia eficiente para a recuperação da pectinase, proporcionando elevados índices de purificação e recuperação enzimática.

A caracterização bioquímica indicou que a enzima apresenta estabilidade em condições moderadamente alcalinas e temperatura intermediária, além de sofrer influência positiva de determinados íons metálicos. A análise eletroforética confirmou a natureza monomérica da pectinase.

Adicionalmente, a purificação enzimática promoveu alterações nos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da pectinase, indicando mudanças na eficiência catalítica e na interação enzima/substrato, permitindo melhorar o desempenho nutricional e o aproveitamento de nutrientes para sua aplicação biotecnológica.

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que a pectinase apresentou baixa toxicidade nas condições avaliadas, sugerindo potencial de segurança para futuras aplicações biotecnológicas.

Os resultados obtidos demonstram o potencial da pectinase produzida por *Trichoderma orientale* a partir de casca de limão como uma alternativa sustentável para produção enzimática, com aplicação em processos industriais e melhor aproveitamento de nutrientes em dietas de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH R, *et al.* Saleen F, Naz S. Process optimization for pectinase production by locally isolated fungal strain using submerged fermentation. **Bioscience Journal**, v.33, n.4, p. 1025- 1032, 2018.

AFZIA, N. Otimização das condições para produção de pectinases em fermentação sólida utilizando casca de limão, 2024.

AHMED T. *et al.* Optimization of substrate composition for pectinase production from Satkara (*Citrus macroptera*) peel using *Aspergillus niger*-ATCC 1640 in solid-state fermentation. **Heliyon**, v. 7, n. 10, 2021.

ALBERTSSON, P. A. Partition of Cell Particles and Macromolecules. 3rd Edition, John Wiley, **New York**, 1986.

AMANDE, T. *et al.* Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 59-62, 2013.

ANTOV, M. G., PERICIN, D. M., PEJIN, S. N. Pectinases partitioning in aqueous twophase systems: an integration of the systems poly (ethylene glycol)/crude dextran and poly(ethylene glycol)/ammonium sulphate. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 69, p. 299-307, 2004.

ANTOV, M. *et al.* Partitioning of pectinase produced by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system polyethylene glycol 4000/crude dextran at different initial pH values. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 3, p. 305-310, 2004.

ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of Crotalaria juncea fiber. 3 **Biotech**, v. 6, n. 2, p. 201, 2016.

ANAND, G., YADAV, S. & YADAV, D. Produção, purificação e caracterização bioquímica de uma exo-poligalacturonase de *Aspergillus niger* MTCC 478 adequada para clarificação de suco de laranja. 3 **Biotech**, v 7, n.122, p. 122, 2017.

AROTUPIN, D. J., AKINYOSOYE, F. A., & ONIFADE, A. K. Purification and characterization of pectinmethylesterase from *Aspergillus repens* isolated from cultivated soil. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 12, p. 1991–1998, 2008.

AWAN J., SIKANDAR S., AFZAL I. Production of pectinases towards the extraction of natural pectin from orange peels using fungal sources. *Pakistan Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 3 n. 1, p. 112-118, 2022.

BAKSHI G, ANANTHANARAYAN L. Characterization of lemon peel powder and its application as a source of pectin degrading enzyme in clarification of cloudy apple juice. *J Food Sci Technol*, v. 59, n. 7, p. 2535-2544, 2022.

BHATTACHARYYA R. *et al.* Thermostable and organic solvent-tolerant acid pectinase from *Aspergillus terreus* FP6: purification, characterization and evaluation of its phytopigment extraction potential. *3 Biotech*, v. 11, n.11, p. 487, 2021.

BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical Journal*, v. 19, p. 338–339, 1925.

CARLI, S., MELEIRO, L. P., & WARD, R. J. Biochemical and kinetic characterization of the recombinant GH28 *Stereum purpureum* endopolygalacturonase and its biotechnological application. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 137, p. 469–474, 2019.

DARABZADEH, N. *et al.* Optimization of cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus flavus* AT-2. *Biotechnology Progress*, v. 34, n. 5, p. 1107-1118, 2018.

DELIBERADOR LR, BATALHA, MO, FREIRE CD, FONTENELLE AM, SABADINI FC. Perdas e desperdícios de alimentos ao longo da cadeia de suprimentos: uma análise de regiões desenvolvidas e em desenvolvimento. *South American Development Society Journal*, v.4, n. 01, p.11-27, 2018.

EL ENSHASY HA, ELSAYED EA, SUHAIMI N, MALEK RA, ESAWY M. Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC Biotechnol*, v. 18, n. 71, 2018.

EYRING, H. The activated complex in chemical reactions. *Journal of Chemical Physics*, v. 3, n. 2, p. 107–115, 1935.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:2009**. *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva: ISO, 2009.

JALIL M. T. M, IBRAHIM D. Partial Purification and Characterisation of Pectinase Produced by *Aspergillus niger* LFP-1 Grown on Pomelo Peels as a Substrate. *Tropical Life Sciencs Research*, v. 32, n. 1, p. 1-22, 2021.

JOHANSSON, G.; ANDERSSON, M.; TJERNELD, F. Aqueous Two-Phase Systems in Protein Purification. In *Separation Processes in Biotechnology*. Marcel Dekker, 1998.

KANT, S., VOHRA, A., & GUPTA, R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, v. 87, n. 1, p. 11–16, 2013.

KAUL K. *et al.* Valorization of agro-industrial waste for pectinase production and its influence on circular economy, *Food and Bioproducts Processing*, v.148, p.141-153, 2024.

KESTER HC, VISSER J. Purificação e caracterização de poligalacturonases produzidas pelo fungo hifal *Aspergillus niger*. *Biotechnol Appl Biochem* v. 12, n. 2, p. 150–160, 1990.

KUMAR, R.; SINGH, S.; KAUR, A. Solid-state fermentation for industrial enzyme production: recent trends and advances. *Bioresource Technology Reports*, v. 21, 2023.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 1970.

LI, Q. *et al.* Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase. *Enzyme Microb Technol*, v. 72, p. 42-48, 2015.

LIU, Y. *et al.* Enhanced stability of purified pectinases: effects of purification on pH and temperature tolerance. *Process Biochemistry*, v. 121, p. 45–53, 2024.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, v. 56, n. 3, p. 658–666, 1934.

MACIEL, M. H. C. Abordagem polifásica para identificação de linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de Poligalacturonases. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2013.

MAHMOUD. S. A. *et al.* In vitro evaluation of antimicrobial, antitumor, and anti-SARS-cov-2 properties of cellulase enzyme produced by *Aspergillus niger*. ***Biochemistry and Biophysics Reports***, v. 43, 2025.

MARTÍNEZ-TRUJILLO, A. *et al.* Utilização de resíduos de frutas para a produção de pectinase por *Aspergillus flavipes* FP-500 e *Aspergillus terreus* FP-370, ***Letters in Applied Microbiology***, v. 53, n. 2, p. 202–209, 2011.

MEENA K. K, JAIPAL M. K, SINGH U. Cinética de produção e caracterização da enzima pectinase de *Aspergillus niger*. South Asian. ***Journal of Food Technology and Environment***, v. 1, n. 2, p. 131–135, 2015.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. ***Biochemische Zeitschrift***, v. 49, p. 333–369, 1913.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. ***Analytical Chemistry*** v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. ***Journal of Immunological Methods***, v. 65 n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOREIRA, A. M. Bioeconomia: plataforma mundial de inovação e sustentabilidade nas cadeias agroindustriais. ***Revista Processos Químicos***, v. 10, n. 20, p. 351-353, 2016.

MULATU, A. *et al.* Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling. ***Microorganisms***, v. 9, p. 1675, 2021.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). ***Journal of***

Chromatography B: Analytical Technologies Biomedical and Life Sciences, v. 1025, p. 16-24, 2016.

NASCIMENTO, M. B. *et al.* Equilibrium data and thermodynamic studies of α -amylase partition in aqueous two-phase systems. Amsterdã, **Fluid Phase Equilibria**, v. 463, p. 69-79, 2018.

NITURE SK, PANT A. Purificação e caracterização bioquímica da poligalacturonase II produzida em meio semi-sólido por uma cepa de *Fusarium moniliforme*. **Microbiol Res**, 159, p. 305–314, 2004.

NURIN A. *et al.* Optimization of conditions for production of pectinase in solid-state fermentation with *Aspergillus flavus* using dried Assam lemon peel powder as substrate, **Measurement: Food**, v. 14, 2024.

OUMER O. J, ABATE D. Characterization of Pectinase from *Bacillus subtilis* Strain Btk 27 and Its Potential Application in Removal of Mucilage from Coffee Beans. **Enzyme Research**, 7686904, 2017.

PAGNONCELLI, J. Purification, characterization and application of an exo-poligalacturonase from *Penicillium janthinellum* VI2R3M. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2018.

PAULING, L. Molecular architecture and biological reactions. **Chemical & Engineering News**, v. 24, p. 1375–1377, 1946.

PEDROLI D. B, CARMONA E. C. Purification and Characterization of a Unique Pectin Lyase from *Aspergillus giganteus* Able to Release Unsaturated Monogalacturonate during Pectin Degradation. **Enzyme Research**, 353915, 2014.

PINHEIRO VE *et al.* A poligalacturonase de *Neosartorya glabra* produzida a partir de cascas de frutas como indutores tem potencial para aplicação em sucos de maracujá e maçã. **Brazilian Journal Food Technol**, v. 20, p. 1–11, 2017.

POLIZELI Mde L, JORGE J. A, TERENCE H. F. Produção de pectinase por *Neurospora crassa*: purificação e caracterização bioquímica da atividade da poligalacturonase extracelular. **J Gen Microbiol**, v. 137, n. 8, p. 1815–23, 1991.

PRIYA, V.; ASWIN, G.; NITHISH, P. Bioconversão de resíduos de casca de limão para produção de pectinase utilizando *Fusarium solani* em fermentação em meio líquido e sua aplicação. **Journal of Emerging Technologies and Innovative Research** , v. 9, n. 7, p. 692-698, 2022.

RASIT, N. *et al.* Otimization of pectinase production under solid-state fermentation. **Science & Technology Journal**, v. 25, 2021.

RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase partitioning as a bioseparation tool. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 2, p. 169-170, 2004.

RODRIGUES P. O. *et al.* Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683-2693, 2020.

ROZENDO, AS. Avaliação cinética, purificação e caracterização da pectinases produzida por *Trichoderma* spp, 2024.

SATAPATHY, S. *et al.* Produção de pectinase de relevância industrial a partir de *Aspergillus parvisclerotigenus* KX928754 utilizando bagaço de maçã como substrato promissor. **Journal of Taibah University for Science**, v. 15, n. 1, p. 347–356, 2021.

SANTOS, A. F. *et al.* Activity modulation of *Trichoderma asperellum* pectinase under varying pH conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 245, p. 124789, 2023.

SILVÉRIO, S. C. *et al.* Laccase recovery with aqueous two-phase systems: Enzyme partitioning and stability. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, n. 37, p. 1381-1177, 2013.

SHINY, M. B. *et al.* Carbon catabolite repression in pectin digestion by the phytopathogen *Dickeya dadantii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 1, 2022,

SHRESTHA, S. *et al.* Otimização da produção de múltiplas enzimas por *Bacillus* sp. isolado de caldo de cultura bacteriana contaminado e investigação de seu potencial efeito antimicrobiano na formação de biofilme. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 1 p. 049 – 692, 2022.

SING, B. Produção de pectinases por *Trichoderma* spp em resíduos vegetais e caracterização enzimática, 2024.

STATSOFT INC. STATISTICA (data analysis software systems) version 8.0. 2008.

SUHAIMI, N. *et al.* Optimization of pectinase production by *Aspergillus niger* using orange pectin based medium. ***Journal of Chemical and Pharmaceutical Research***, v. 8, n. 2, p. 259- 268, 2016.

VALSANGIACOMO, C. *et al.* Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. ***Physiological and Molecular Plant Pathology***, v. 40, n. 1, p. 63-77, 1992.

YADAV S. *et al.* Purificação e caracterização de uma exo-poligalacturonase secretada por *Rhizopus oryzae* MTCC1987 e seu papel na maceração da fibra de *Crotalaria juncea*. ***Biologia***, v. 67, n. 6, p. 1069–1074, 2012.

YASIN, N. *et al.* Pectinolytic potential of indigenous *Trichoderma* strains originated from the north western regions of Pakistan. ***Pakistan Journal of Botany***, 54. P. 711-715, 2021.

ZHANG, H. *et al.* Influence of aqueous two-phase systems on enzyme stability: structural insights and industrial implications. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 183, p. 110249, 2025.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA PECTINASE CÍTRICA DE *Trichoderma orientale* NA MODULAÇÃO DA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA E NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE FRANGOS DE CORTE

O artigo será submetido à revista International Journal of Macromolecules, classificada como Qualis CAPES A1 na área de Zootecnia, com fator de impacto 8,5.

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de pectinases produzidas por *Trichoderma orientale* utilizando casca de limão como substrato em fermentação sólida como aditivo enzimático em dieta de frangos de corte sobre o desempenho zootécnico e perfil bioquímico do sangue. Foram utilizados 80 frangos de corte machos de crescimento lento da linhagem Pescoço Pelado com idades entre 1 e 31 dias de idade. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos, 5 repetições por tratamento de 8 aves cada. Os tratamentos consistiram em: tratamento 1: tratamento controle (ração comercial padrão) e o tratamento 2: tratamento ração comercial + 50U/g de extrato enzimático (ambos obtidos a partir da casca de limão). Nenhuma das variáveis de desempenho avaliadas apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0.10$). Isso indica que a suplementação com 50U/g de extrato enzimático bruto de *Trichoderma orientale* não foi suficiente para promover alterações mensuráveis nas características de desempenho avaliadas durante o

período experimental (21 a 31 dias). A suplementação com pectinase produzida por *Trichoderma orientale* extraída da casca do limão não promoveu alterações significativas na maioria dos parâmetros bioquímicos sanguíneos avaliados, indicando que sua utilização é metabolicamente segura para frangos de corte. Conclui-se que a suplementação com 50U/g não afetou o desempenho zootécnico de frangos de corte, indicando a necessidade de estudos adicionais com diferentes níveis de inclusão.

Palavras-chave: Aditivo enzimático; Desempenho de frangos; Nutrição avícola; Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effects of including pectinases produced by *Trichoderma orientale* using lemon peel as a substrate in solid-state fermentation as an enzymatic additive in broiler chicken diets on zootechnical performance and blood biochemical profile. Eighty slow-growing male Naked Neck broiler chickens aged between 1 and 31 days were used. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD), with two treatments, 5 replicates per treatment of 8 birds each. The treatments consisted of: treatment 1: control treatment (standard commercial feed) and treatment 2: commercial feed + 50 U/g of enzymatic extract (both obtained from lemon peel). None of the performance variables evaluated showed a statistically significant difference between treatments ($p > 0.10$). This indicates that supplementation with 50 U/g of crude enzymatic extract of *Trichoderma orientale* was not sufficient to promote measurable changes in the performance characteristics evaluated during the experimental period (21 to 31 days). Supplementation with pectinase produced by *Trichoderma orientale* extracted from lemon peel did not promote significant changes in most of the evaluated blood biochemical parameters, indicating that its use is metabolically safe for broiler chickens. It is concluded that supplementation with 50 U/g did not affect the zootechnical performance of broiler chickens, indicating the need for further studies with different inclusion levels.

Keywords: Enzyme additive; Chicken performance; Poultry nutrition; Agro-industrial waste.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura de corte é um dos principais setores da agroindústria, e no Brasil apresenta um dos maiores meios de fortalecimento econômico. Esta se destaca na produção de carnes, buscando menores custos de produção, associado a melhorias na nutrição, genética, manejo, ambiência (Alagawany *et al.*, 2018). O Brasil ocupa posição de destaque nesse setor, sendo um dos maiores exportadores de carne de frango e a cada ano vem se destacando como um dos maiores produtores (ABPA, 2025).

No entanto, os elevados custos com a alimentação representa o principal componente de custo total de produção, correspondendo mais de 70% das despesas sendo o milho e o farelo de soja os principais ingredientes utilizados como fontes de energia e proteína, respectivamente (Cowieson; Ravindran, 2019). Diante desse cenário, há crescente interesse na utilização de aditivos alimentares capazes de melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes presentes nos ingredientes convencionais e alternativos para reduzir os custos envolvidos sem comprometer a produtividade (Ludke *et al.*, 2021).

Entre os recursos biotecnológicos empregados, destacam-se as enzimas pectinases, tem destaque especial tem atraído atenção devido à sua capacidade de hidrolisar polissacarídeos não amiláceos, como a pectina, presentes em subprodutos vegetais, contribuindo para a melhoria da digestibilidade, da absorção de nutrientes e do desempenho produtivo das aves (Vaz *et al.*, 2020). A presença de pectina pode

aumentar a viscosidade da digesta intestinal, reduzindo a digestibilidade dos nutrientes e comprometendo o desempenho produtivo das aves. Dessa forma, a utilização de pectinase na dieta pode contribuir para a redução da viscosidade intestinal, promovendo maior digestibilidade e absorção de nutrientes (Walker *et al.*, 2024).

Além disso, a utilização de enzimas exógenas permite a inclusão de subprodutos agroindustriais nas dietas, contribuindo para a redução dos custos de alimentação e para o aproveitamento sustentável desses resíduos. Entre esses subprodutos, destacam-se os resíduos da indústria cítrica, como a casca de limão, que apresenta elevado teor de pectina e potencial para utilização na produção de enzimas pectinolíticas (Oumer; Abate, 2017). A casca de limão é um resíduo abundante, de baixo custo e rico em compostos estruturais que podem ser utilizados como substrato para a produção de pectinase por microrganismos, como fungos e bactérias, tornando-se uma alternativa promissora para a produção biotecnológica dessa enzima (Sing, Singh; Kumar, 2024). Nesse contexto, a utilização da pectinase produzida a partir da casca de limão como aditivo alimentar na nutrição de frangos de corte representa uma estratégia inovadora e sustentável.

O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da inclusão de pectinases produzidas por *Trichoderma orientale* utilizando casca de limão como substrato em fermentação sólida como aditivo enzimático em dieta de frangos de corte de 1 a 31 dias de idade sobre o desempenho produtivo e perfil bioquímico do sangue.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e aprovação ética

O experimento foi realizado em galpão convencional para frangos de corte do Colégio Técnico pertencente à Universidade Federal do Piauí (UFPI) no Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE), localizado no município de Bom Jesus-PI.

Todos os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI/CPCE), protocolo CEUA-BJ 008/2025.

2.2 Aditivo enzimático: Citrus-Pectinase de *Trichoderma orientale* (CP-TO)

A pectinase utilizada neste estudo foi produzida por *Trichoderma orientale* utilizando casca de limão como substrato em fermentação sólida, sendo denominada de CP-TO. A produção dessa enzima foi realizada em nas melhores condições de fermentação em estado sólido: 3 g de casca de limão, 50% de umidade e temperatura de 35 °C por 24 horas.

O extrato enzimático bruto foi purificado por sistema de duas fases aquosas (SDFA), utilizando soluções de polietilenoglicol (PEG 1500 g/mol, 17%) e fosfato de sódio (18%), com pH 8,0. Nesta condição, a pectinase apresentou coeficiente de partição $K=0,82$, indicando migração preferencial para a fase inferior rica em sal. A fração salina contendo a enzima foi posteriormente liofilizada, resultando em pó enzimático que foi armazenado a -20 °C até o momento da incorporação na ração. A atividade enzimática do material utilizado foi de 50U/g.

2.3 Animais, instalações e delineamento experimental

Foram utilizados 80 animais frangos de corte machos de crescimento lento da linhagem Pescoço Pelado (Globo Aves®) com idades entre 1 e 31 dias de idade, devidamente vacinados. Aos 17 dias de idade as aves foram distribuídas de forma que todas as unidades experimentais tivessem pesos semelhantes e as gaiolas metabólicas medindo 1,5 m², foram preparadas com bandejas coletoras de excretas revestidas de plástico para evitar contaminação e perda de amostras experimentais. Cada gaiola estava equipada com um sistema de aquecimento por campânulas elétricas, comedouros e bebedouros. A água utilizada de forma livre e foi ofertada à vontade para aves.

O monitoramento de temperatura do ar do galpão foi feito por meio de termômetros de máxima e mínima, mantidos dentro do galpão próximo das gaiolas. Foram realizadas diariamente as leituras dos termômetros, três vezes ao dia (08, 14 e 18 horas) durante todo o período experimental. Posteriormente esses dados foram convertidos no Índice de temperatura e umidade (ITU). O cálculo do ITU foi realizado de acordo com Thom (1959), utilizando a seguinte fórmula:

Onde:

- Tbs é a temperatura de bulbo seco (°C);
- Tpo é a temperatura do ponto de orvalho (°C).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dois tratamentos, 5 repetições por tratamento de 8 aves cada. Os tratamentos consistiram em:

- Tratamento 1: Tratamento controle (ração comercial padrão);
- Tratamento 2: Tratamento ração comercial + 50 U/g da pectinase CP-TO.

Foram utilizadas rações comerciais (fareladas), as mesmas foram pesadas e suplementadas com pectinase na concentração de 50U/g de ração. Após homogeneização do aditivo enzimático, as dietas foram fornecidas aos animais durante o período experimental (21 a 31 dias). A composição das rações comerciais está descrita a seguir na tabela 1.

Tabela 1. Composição das rações comerciais utilizadas durante o período experimental.

Níveis de Garantia	kg
Proteína Bruta (mínimo)	190 g
NDT (mínimo)	760 g
Extrato Etéreo (mínimo)	22 g
Fibra Bruta (máximo)	25 g
Umidade (máximo)	125 g
Matéria Mineral (máximo)	20 g
Cálcio (mínimo)	5920 mg
Cálcio (máximo)	7305 mg
Fósforo (mínimo)	5375 mg
Enxofre (mínimo)	1360 mg
Magnésio (mínimo)	1512 mg
Potássio (mínimo)	375 mg
Sódio (mínimo)	1510 mg
Cobalto (mínimo)	0,1 mg
Cobre (mínimo)	12 mg

Cromo (mínimo)	0,1 mg
Ferro (mínimo)	32 mg
Flúor (máximo)	15 mg
Iodo (mínimo)	1 mg
Manganês (mínimo)	50 mg
Selênio (mínimo)	0,5 mg
Zinco (mínimo)	60 mg
Lisina (mínimo)	9270 mg
Metionina (mínimo)	3560 mg
Ácido Fólico (mínimo)	1 mg
Ácido Pantotênico (mínimo)	9 mg
Ácido Nicotínico (mínimo)	25 mg
Biotina (mínimo)	0,01 mg
Colina (mínimo)	130 mg
Vitamina A (mínimo)	9450 UI
Vitamina B1 (mínimo)	1 mg
Vitamina B2 (mínimo)	4 mg
Vitamina B6 (mínimo)	2 mg
Vitamina B12 (mínimo)	mcg
Vitamina D (mínimo)	2625 UI
Vitamina E (mínimo)	33 UI
Vitamina K (mínimo)	2 mg
Enramicina (mínimo)	5 mg
Fitase (mínimo)	999 FTU
Glucomananos	145 mg
Monensina	55 mg

2.4 Ensaio de desempenho

As aves e a ração foram pesadas no início (21 dias) e no final (31 dias) do período experimental, incluindo as sobras de alimento. Com esses dados, foram calculados os seguintes parâmetros:

- *Ganho de peso (GP)*: determinado pela diferença entre o peso final e o peso inicial das aves, podendo ser expresso em quilogramas por ave.

$$GP (kg) = \text{Peso final (kg)} - \text{Peso inicial (kg)}$$

- *Consumo de ração (CR)*: calculado pela diferença entre a quantidade de ração fornecida e as sobras, podendo ser também expresso por ave.

$$CR (kg) = \text{Ração fornecida (kg)} - \text{Sobras (kg)}$$

- *Conversão alimentar (CA)*: obtida a partir da razão entre o consumo de ração e o ganho de peso das aves, indicando a eficiência da conversão alimentar.

$$CA = \frac{\text{Consumo de ração (kg)}}{\text{Ganho de peso (kg)}}$$

- *Viabilidade (%)*: determinada pelo monitoramento diário da mortalidade, sendo calculada pela proporção entre o número de aves vivas ao final do experimento e o número de aves alojadas, expressa em porcentagem.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de aves vivas}}{\text{Número de aves alojadas}} \times 100$$

Todos os cálculos foram realizados considerando os dados individuais das aves e os valores médios por tratamento, garantindo a avaliação do desempenho produtivo e da sobrevivência ao longo do período experimental.

2.5 Caracterização bioquímica do sangue

A coleta de sangue foi realizada ao final do experimento, às 07:00 h, antes do período de calor. Foram utilizadas 2 aves por gaiola, totalizando 40 aves, sendo uma ave de cada repetição. A coleta foi realizada por punção da veia braquial (asa), retirando-se 2 mL de sangue por ave.

2.5.1 Determinação dos níveis de glicose

Os níveis de glicose foram determinados por teste enzimático colorimétrico, utilizando o Kit Bioclin Glicose Monoreagente (referência K082-2), seguindo as instruções do fabricante. As amostras do extrato, o reagente padrão e o branco (controle negativo) foram adicionados a placas de poliestireno (Sarstedt), devidamente

identificadas, homogeneizadas e incubadas a 37°C por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em leitor automático (iMark™ Microplate Absorbance Reader) a 490 nm. A concentração de glicose foi calculada pela média de cada grupo, em mg/dL, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{Absorbância do padrão}}$$

2.5.2 Quantificação de Albumina

A dosagem de albumina foi realizada com o Kit Bioclin Albumina Monoreagente. Em presença da albumina, o corante Verde de Bromocresol forma um complexo colorido, cuja absorbância difere do corante livre, permitindo a quantificação da proteína. A leitura foi realizada em leitor automático (iMark™ Microplate Absorbance Reader) e os resultados expressos em g/dL.

2.5.3 Determinação do Colesterol e triglicerídeos

Os níveis de colesterol e triglicerídeos no soro sanguíneo foram determinados utilizando kits comerciais Bioclin (Colesterol Monoreagente e Triglicerídeos Monoreagente), de acordo com as instruções do fabricante. Ambos os ensaios são baseados em reações enzimáticas que produzem um complexo colorido, cuja intensidade é proporcional à concentração do analito, medida em espectrofotômetro a 500 nm. A concentração foi calculada a partir da absorbância em relação ao padrão fornecido no kit, sendo os resultados expressos em mg/dL.

$$\text{Colesterol} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

$$\text{Triglicerídeos} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

2.5.4 Quantificação de proteínas

A determinação de proteínas totais foi realizada com o Kit Bioclin Proteínas Totais Monoreagente, utilizando o extrato enzimático parcialmente purificado. O ensaio baseou-se na reação do biureto em meio alcalino, na qual os íons Cu²⁺ formam quelatos

com as ligações peptídicas das proteínas, originando um complexo de coloração violeta. A absorbância foi medida a 546 nm em leitor de microplacas (iMark™ Microplate Absorbance Reader) e a concentração de proteínas nas amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de proteína (Coverdale *et al.*, 2019).

2.6 Análises estatísticas

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e cinco repetições. Após verificação de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene), as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($\alpha = 0.05$). O tamanho de efeito foi estimado pelo d de Cohen. Todas as análises foram realizadas no software R versão 4.5.2 (R Core Team, 2025).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dados ambientais durante o experimento

Durante o período experimental, foram registradas as seguintes temperaturas térmicas no ambiente, com oscilações entre 14,85 e 33,0, resultando em uma média de 23,92 °C. A umidade relativa do ar apresentou valores de 33% e 55% com uma média de 44%. O índice de temperatura e umidade (ITU) oscilou entre 56,87 e 83,14, com valor médio de 70,0, conforme demonstrado na Tabela 2. Indicando condições próximas à zona de conforto térmico para frangos de corte, porém com ocorrência de momentos de estresse térmico por calor durante as horas mais quentes do dia.

Tabela 2. Médias dos dados climáticos durante o período experimental (21 a 31 dias).

Condições climáticas	Máxima	Mínima	Média
Temperatura (°C)	33,0	14,85	23,92
UR* (%)	55	33	44
ITU*	83,14	56,87	70,00

*Umidade relativa; *Índice de temperatura e umidade.

A temperatura máxima de 33,0 sugere que momentos de estresse térmico moderado, principalmente para as aves na fase inicial de criação, enquanto a temperatura mínima de 14,85 representa condições frias durante a noite, sendo desafiadoras para as aves jovens. A UR variou de 33% (mínima) a 55% (máxima),

abaixo do ideal recomendado (50–70%), o que pode agravar a desidratação em períodos quentes e causar ressecamento excessivo da cama em fases frias (Staub *et al.*, 2016).

O sistema termorregulador da ave é pouco desenvolvido para suportar temperaturas elevadas e que em condições de temperatura baixa, o organismo animal reprime sua dissipação de calor para o ambiente e aumenta sua taxa metabólica. As aves mais novas requerem mais calor, sendo que a temperatura de conforto da ave na primeira semana de vida é aproximadamente 32° a 35°C (Almeida; Machado; Scheraiber, 2015).

De acordo com a literatura, para garantir conforto térmico adequado às aves na primeira semana de vida, o ITU deve permanecer dentro da faixa de 72,4 a 80,0 (Abreu e Abreu, 2011). Segundo os autores Cony & Zocche (2004), é importante ressaltar que a umidade não pode cair abaixo de 50%, devido aos efeitos negativos no desempenho do animal. O ITU é um valor considerado adimensional, em que valores de até 74 representam ambientes confortáveis; de 74 a 78 exigem cuidado, alerta; de 79 a 84 são perigosos; e de 85 em diante, podem causar a morte dos animais (Staub *et al.*, 2016).

3.2 Desempenho

Os resultados apresentados na Tabela 3 estão descritos a inclusão da CP-TO na ração dos frangos de corte onde observou uma influência positiva para o desempenho das aves.

Tabela 3. Desempenho de frangos de corte de 21 a 31 dias suplementado com a CP-TO.

Variável	TC	CP-TO	p-valor	Sig
GP (kg)	0,378 ± 0,004	0,364 ± 0,007	0,121	ns
CR (kg)	5,407 ± 0,062	5,385 ± 0,089	0,842	ns
CA	1,789 ± 0,038	1,855 ± 0,064	0,400	ns
CR/A (kg)	0,676 ± 0,008	0,673 ± 0,011	0,842	ns

GP= ganho de peso; CR= consumo de ração; CA= conversão alimentar; CR/A= consumo de ração/ave; TC= tratamento controle; CP-TO = Citrus-Pectinase de *Trichoderma orientale*; ns= não significativo ($p \geq 0.10$); Valores apresentados como Média ± Erro Padrão.

Pode-se observar que em relação a variável ganho de peso, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,121$). O consumo de ração foi equivalente entre os tratamentos ($p=0,842$), com diferença de apenas 0,42%. Não houve diferença significativa na conversão alimentar ($p = 0,400$). O sinal negativo do Cohen's d ($-0,562$, médio) indica uma tendência de melhor conversão alimentar no grupo CP-TO (valores menores são melhores). O consumo individual de ração foi equivalente entre tratamentos ($p=0,842$), refletindo os resultados de consumo total.

Nenhuma das variáveis de desempenho avaliadas apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0.10$). Este resultado indica que a suplementação com 50U/g da CP-TO não foi suficiente para promover alterações mensuráveis nas características de desempenho avaliadas durante o período experimental.

Embora não tenha havido significância estatística, os tamanhos de efeito fornecem informações importantes sobre a magnitude das diferenças observadas: ganho de peso ($d = 1,097$ - grande). A diferença de 3,92% favorável ao controle, o tamanho de efeito grande indica diferença biologicamente relevante, sugere que a enzima, na dose testada, não promoveu melhora no ganho de peso. A conversão alimentar ($d=-0,562$ - médio). A diferença de 3,54% favorável ao extrato limão, o tamanho de efeito médio sugere potencial melhora na eficiência alimentar, indica que a enzima pode ter auxiliado na digestibilidade dos nutrientes. O consumo de ração ($d=0,131$ - trivial) confirma que o extrato não alterou a palatabilidade ou o apetite das aves.

A ausência de mortalidade (0%) e viabilidade de 100% em ambos os grupos indica: adequadas condições de manejo e bem-estar animal, ausência de toxicidade do extrato enzimático e boa qualidade sanitária e adaptação das aves ao sistema de criação.

A suplementação da CP-TO nas dietas de frangos de corte demonstrou resultados promissores de desempenho zootécnico. Estudos recentes indicam que a inclusão de farinha de casca de laranja, com ou sem várias enzimas, aumenta significativamente o ganho de peso e melhora a eficiência alimentar em frangos de corte entre 22 e 42 dias de idade (Abd El Latif *et al.*, 2023). Os autores, Vaz *et al.*, 2020 relataram que 400 g/ton de complexo multienzimático contendo pectinase, fitase e protease em frangos de 1-42 dias elevou o ganho médio diário (GMD) para 65,2 g/dia e reduziu a conversão alimentar (CA) para 1,82 kg/kg, contra 63,8 g/dia e 1,87 kg/kg do

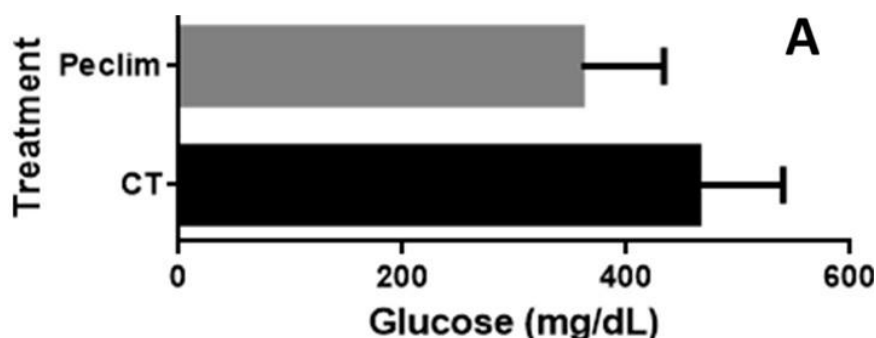
controle, atribuindo-se à hidrólise sinérgica de polissacarídeos não-amiláceos. Magied *et al.*, 2022 observaram incrementos de 4,8% no GMD, redução de 5,2% no consumo de ração (CR) e melhoria de 8,1% na CA com pectinase + protease CIBENZA em dietas energeticamente reduzidas para frangos de 1-35 dias, destacando a ação antinutricional mitigada da pectina em ingredientes vegetais.

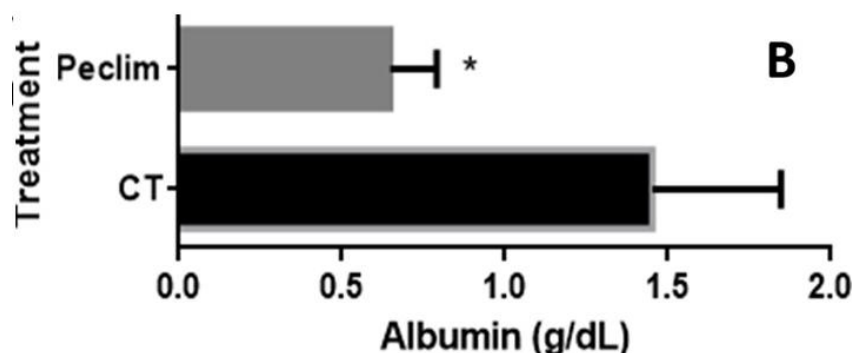
3.3 Perfil bioquímico do sangue

Na Figura 1 podemos observar as concentrações de glicose e albumina com a utilização da CP-TO (Peclim) em relação ao tratamento controle. A concentração de glicose do tratamento Peclim mostrou concentração menor que o CT (tratamento controle) (Figura 1A). Porém esta redução não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando que a suplementação com a enzima não influenciou significativamente os níveis séricos de glicose no sangue das aves.

Segundo Thrall *et al.* (2015), a ausência de alterações significativas na glicose sanguínea sugere que o metabolismo energético das aves permaneceu equilibrado, indicando que a suplementação com pectinase não causou distúrbios metabólicos.

Figura 1. Concentrações de glicose (A) e albumina (B) em extrato purificado obtido a partir de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.



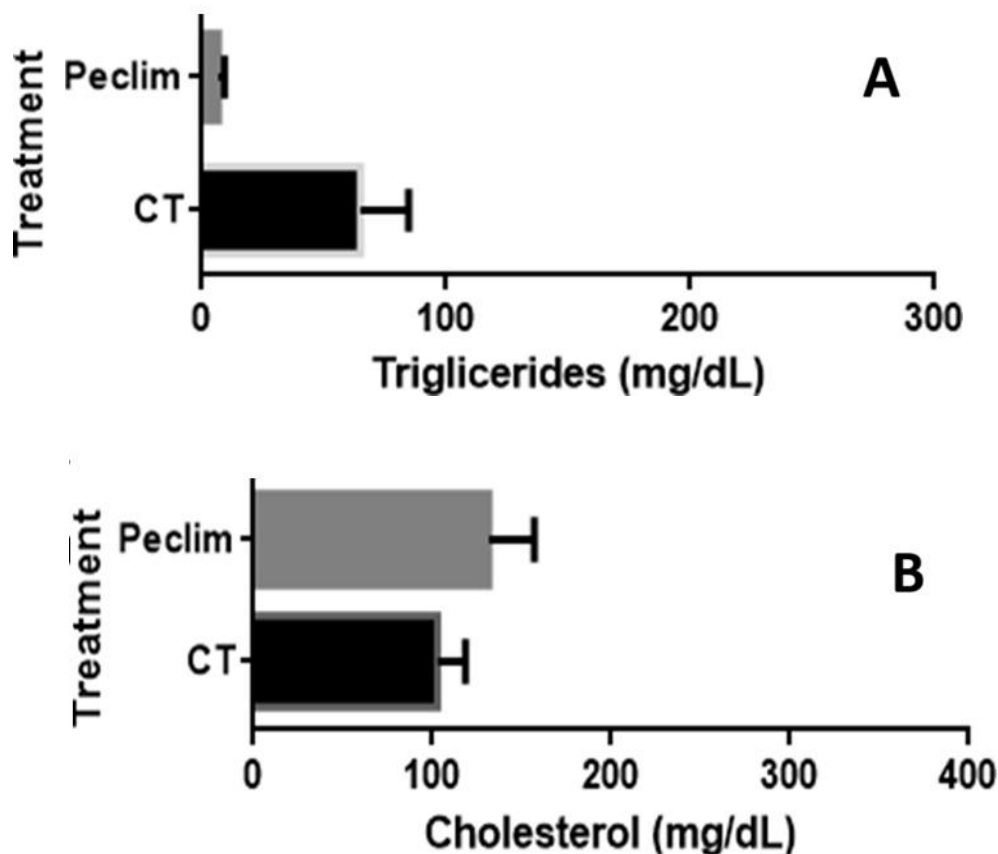


Em relação à albumina (Figura 1B), observou-se que a concentração foi significativamente menor no extrato com a enzima pectinase extraída da casca de limão (Peclim) a partir de *Trichoderma orientale*, em comparação ao controle (CT), conforme indicado pelo asterisco que representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). A suplementação com pectinase do limão reduziu significativamente os níveis séricos de albumina em comparação ao grupo controle. A redução observada no presente estudo pode estar associada a alterações no metabolismo proteico decorrentes da suplementação enzimática. De acordo com Thrall *et al.* (2015), reduções na concentração sérica de albumina podem ocorrer em resposta a alterações na síntese hepática, na disponibilidade de aminoácidos ou na demanda metabólica proteica.

Em relação às concentrações de triglicerídeos e colesterol (Figura 2), também foram observados variações dos níveis entre os tratamentos avaliados. A concentração de triglicerídeos foi numericamente inferior no extrato obtido do cultivo em casca de limão (Peclim) em relação ao controle (CT), embora essa diferença não tenha apresentado significância estatística, mesmo sendo numericamente inferior. Ou seja, Peclim diminuiu numericamente os triglicerídeos, mas é estatisticamente igual ao controle não havendo efeito significativo.

Segundo Scanes (2015), a concentração de triglicerídeos é um importante indicador do metabolismo energético em aves, e sua estabilidade sugere que não houve comprometimento da homeostase metabólica. Sendo assim os resultados observados no presente estudo indicam que a suplementação com pectinase do limão não alterou significativamente o metabolismo lipídico das aves, sugerindo que sua utilização não comprometeu a síntese, absorção ou utilização de lipídios.

Figura 2. Concentrações de triglicerídeos (A) e colesterol (B) em extrato obtido a partir de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.



Por outro lado, os níveis de colesterol foram mais elevados no extrato Peclim quando comparados ao controle. Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando que a suplementação com pectinase não influenciou significativamente os níveis séricos de colesterol das aves. Peclim aumentou numericamente o colesterol, não houve diferença significativa, e estatisticamente é igual ao controle.

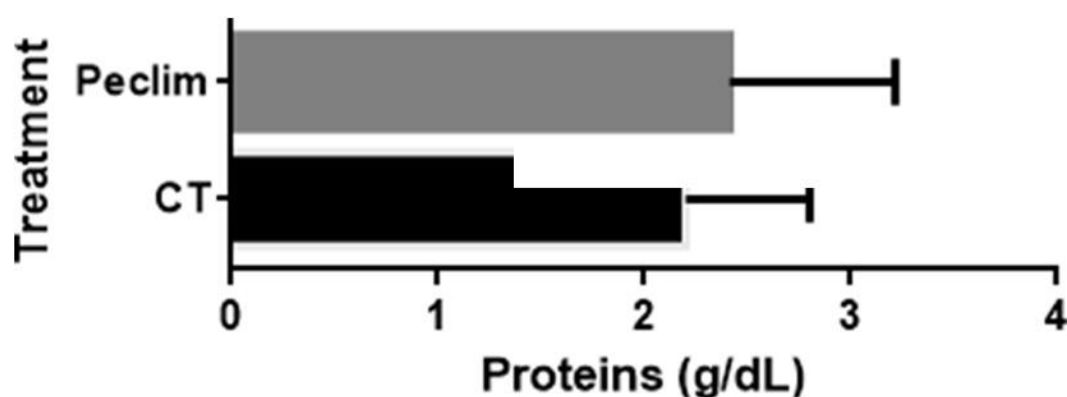
A utilização de enzimas exógenas na alimentação de frangos tem sido associada principalmente à melhoria da digestibilidade dos nutrientes, podendo influenciar indiretamente o metabolismo lipídico. No entanto, conforme relatado por Bedford e Cowieson (2012), a suplementação enzimática nem sempre resulta em alterações significativas nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, especialmente quando as aves apresentam adequado equilíbrio nutricional. Segundo Scanes (2015), a manutenção de

níveis estáveis de colesterol indica adequado funcionamento do metabolismo lipídico e do sistema hepático em aves. Dessa forma, a ausência de diferença significativa observada neste estudo sugere que a suplementação com pectinase do limão não comprometeu a homeostase lipídica das aves, indicando que essa enzima pode ser utilizada sem provocar alterações metabólicas adversas relacionadas ao colesterol.

Por fim, os resultados demonstram que a suplementação com pectinase do limão não influenciou significativamente a concentração sérica de colesterol, indicando que o metabolismo lipídico das aves permaneceu dentro da normalidade fisiológica.

A Figura 3 mostra as concentrações de proteínas totais e fosfatase alcalina no extrato contendo a pectinase extraída da casca de limão (Peclim). Podemos observar que não houve diferença significativa sobre as variáveis de proteínas e fosfatase alcalina, que em relação ao tratamento controle apresentaram maiores valores no sangue dos frangos de corte.

Figura 3. Quantificação de proteínas em extrato obtido a partir de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.

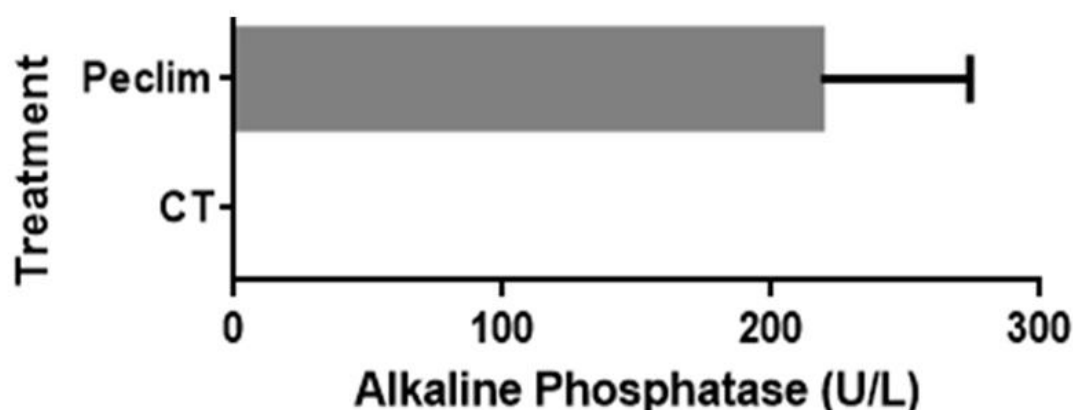


Observa-se que as aves suplementadas com pectinase da casca de limão (Peclim) apresentou maior concentração de proteína total em relação ao controle. Porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), indicando que a suplementação

com pectinase do limão não influenciou significativamente a concentração sérica de proteína total das aves. Estaticamente o tratamento Peclim é igual ao tratamento controle. De acordo com Scanes (2015), a manutenção da proteína total dentro dos valores fisiológicos normais indica que o fígado está desempenhando adequadamente sua função de síntese proteica e que o metabolismo proteico está equilibrado. Esse resultado sugere que a suplementação com pectinase do limão não causou efeitos adversos sobre a função hepática ou o estado nutricional das aves.

Na Figura 4 observa-se que as aves suplementadas com pectinase do limão (Peclim) apresentaram valores numericamente superiores de fosfatase alcalina em comparação ao grupo controle. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$), indicando que a suplementação com pectinase não influenciou significativamente a atividade sérica dessa enzima.

Figura 4. Concentrações de fosfatase alcalina em extrato purificado obtido a partir de *Trichoderma orientale* cultivado em casca de limão, em comparação com o extrato controle.



Em frangos de corte, a atividade sérica da fosfatase alcalina é fortemente influenciada pela taxa de crescimento, especialmente devido à intensa atividade osteoblástica durante o desenvolvimento corporal. Segundo Scanes (2015), aves jovens apresentam naturalmente maiores níveis dessa enzima em função da elevada deposição óssea, sendo esse aumento considerado um processo fisiológico normal. Aos 31 dias de idade, os frangos ainda se encontram em fase ativa de crescimento, o que justifica a presença de valores relativamente elevados dessa enzima no presente estudo.

A utilização de enzimas exógenas, como a pectinase, tem como principal objetivo melhorar a digestibilidade dos nutrientes e a eficiência alimentar. Segundo Bedford e Cowieson (2012), a suplementação enzimática pode melhorar a disponibilidade nutricional sem necessariamente alterar parâmetros bioquímicos séricos relacionados à função hepática.

Sendo assim, os resultados indicam que a suplementação com pectinase de limão não influenciou significativamente a atividade sérica da fosfatase alcalina nas aves. Esse resultado sugere que a utilização de pectinase não comprometeu o metabolismo ósseo nem a função hepática das aves, indicando que sua inclusão na dieta é metabolicamente segura sob as condições experimentais avaliadas.

4 CONCLUSÕES

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento controle e a suplementação com extrato enzimático de *Trichoderma orientale* para nenhuma das variáveis de desempenho avaliadas ($p > 0.10$).

O ganho de peso apresentou tamanho de efeito grande (Cohen's $d = 1.097$), com tendência numérica favorável ao tratamento controle (+3.92%). A conversão alimentar apresentou tamanho de efeito médio (Cohen's $d = 0,562$), com tendência de melhora no grupo extrato limão (-3.54%), indicando potencial efeito positivo na eficiência alimentar.

O consumo de ração foi equivalente entre tratamentos, indicando que o extrato não alterou a aceitabilidade da dieta. A viabilidade de 100% em ambos os tratamentos

confirma a segurança do uso do extrato enzimático nas condições experimentais testadas.

A suplementação com pectinase do limão não promoveu alterações significativas na maioria dos parâmetros bioquímicos sanguíneos avaliados, indicando que sua utilização é economicamente viável e metabolicamente segura para frangos de corte.

REFERÊNCIAS

ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Concórdia, v. 40. n. 1. p. 1-14, 2011.

ABREU, P. G.; ABREU, V. M. N. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 1-14, 2011.

ABD EL LATIF, M. A. et al. Effect of Dietary Orange Peel Meal and Multi-Enzymes on Productive, Physiological and Nutritional Responses of Broiler Chickens. *Animals*, v. 13, n. 15, p. 24-73, 2023.

ALAGAWANY, M. et al. The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 3, p. 157-164, abr. 2018.

ALMEIDA, C. G.; MACHADO, S. M.; SCHERAIBER, M. Avaliação fisiológica do estresse térmico em frangos de corte – Artigo de Revisão. **Biociências, Biotecnologia e Saúde**, Curitiba, n. 12, 2015.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório Anual completo. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2025/04/ABPA.-Relatorio-Anual-2025.pdf>. Acesso em fevereiro de 2026.

BEDFORD, M. R.; COWIESON, A. J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 76–85, 2012.

CONY, A. V.; ZOCHE, A. T. Manejo de frangos de corte. In: MENDES, A. A.; NÃÃS, I. de A.; MACARI, M. (orgs.) Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, p. 117-136, 2004.

COVERDALE, J. P. *et al.* A metalloproteomic analysis of interactions between plasma proteins and zinc: Elevated fatty acid levels affect zinc distribution. **Metallomics**, v. 11, n. 11, p. 1805–1819, 2019.

COWIESON, A. J. *et al.* A mono-component microbial protease improves performance, net energy, and digestibility of amino acids and starch, and upregulates jejunal expression. of genes responsible for peptide transport in broilers fed corn/wheat-based diets supplemented with xylanase and phytase, **Poultry Science**, v. 98, n. 3, p. 1321-1332, 2019.

LUDKE, J. V. *et al.* Alternativas para alimentação de frangos de corte. **Avicultura Industrial**, Itu, ed. 1309, n. 5, p. 18–22, 2021.

MAGIED H. A. A. *et al.* Effect of enzymes supplementation to low energy and protein corn soybean meal diets on broiler performance and quality of carcass and meat. **Advanced in Animal and Veterinary Sciences**, v. 10 n. 12, p. 2501-2510, 2022.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Characterization of Pectinase from Bacillus subtilis Strain Btk 27 and Its Potential Application in Removal of Mucilage from Coffee Beans. **Enzyme Research**, p. 1-7, 2017.

ROSTAGNO, H. S. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema v. 5, p. 531, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.26626/978-85-8179-206-4.2024.B001>.

SCANES, C. G. **Sturkie's Avian Physiology**. 6. ed. Academic Press, 2015.

STAUB, L. *et al.* Ambiência interna e externa em galpão de frangos de corte nas diferentes épocas do ano e fases de criação. **Nativa**, Sinop, v.4, n.3, p.128-133, 2016.

SINGH, S.; SINGH, A.; KUMAR, A. *Optimization of conditions for production of pectinase in solid-state fermentation with Aspergillus flavus using dried Assam lemon peel powder as substrate*. Measurement, v. 14, p. 100-166, 2024.

THOM, E.C. **The discomfort index**. **Weatherwise**, Boston, v. 12, n. 1, p. 57- 60. 1956.

THRALL, M. A. *et al.* **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2015.

VAZ *et al.* Characteristics of the digestive tract, metabolizability and nutrient retention in broilers fed enzymatic complex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, p. 1069-1074, 2020.

WALKER *et al.* The Effect of including a Mixed-Enzyme Product in Broiler Diets on Performance, Metabolizable Energy, Phosphorus and Calcium Retention. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 328, 2024.