



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PAULA MARIA PEREIRA FREIRE

**IMOBILIZAÇÃO DA ALCALASE® EM CARBOPOL 996 INCORPORADO COM
EXTRATO DE ROMÃ**

FORTALEZA

2024

PAULA MARIA PEREIRA FREIRE

IMOBILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM CARCOPOL 996 INCORPORADO COM
EXTRATO DE ROMÃ

Dissertação apresentada ao Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F934i Freire, Paula Maria Pereira.
Imobilização da alcalase® em carbopol 996 incorporado com extrato de romã / Paula Maria Pereira Freire. – 2024.
88 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
1. Alcalase®. 2. Imobilização enzimática. 3. Carbopol 996. 4. Extrato comercial de romã. 5. Cicatrização de feridas. I. Título.

CDD 660

PAULA MARIA PEREIRA FREIRE

IMOBILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM CARCOPOL 996 INCORPORADO COM
EXTRATO DE ROMÃ

Dissertação apresentada ao Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em 18/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Nathalia Saraiva Rios
Universidade Federal do Rio Grande do Norte(UFRN)

Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano
Universidade Federal de Campina Grande(UFCG)

A Deus.

Aos meus pais, Romualdo e Núbia.

Aos meus irmãos, Danilo e Delano.

Ao jovem, Ítalo Felipe.

AGRADECIMENTOS

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

A Deus, por sempre iluminar e guiar meus caminhos e escolhas ao longo da jornada da vida, abençoando e fortalecendo os meus dias.

À minha família, em especial à minha mãe, pela dedicação incansável, pelo amparo e por ser um pilar fundamental na concretização de mais uma etapa da minha trajetória.

Ao meu pai, cuja ausência física não impede que sua presença seja sentida em minhas lembranças e nas pequenas coisas do cotidiano, influenciando meus valores e decisões.

Aos meus irmãos, pelo apoio constante.

Ao meu estimado amigo Ítalo Felipe, pelas palavras encorajadoras e pelo carinho com que me apresentou este caminho, que hoje sigo com dedicação.

À Professora Doutora Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela excelente orientação, cujo olhar atento e sabedoria foram fundamentais para enxergar o lado positivo em todas as fases da pesquisa.

Aos professores que compuseram a banca examinadora, pelo tempo gentilmente dedicado, pelas críticas construtivas e valiosas contribuições.

Aos colegas da turma de mestrado, por compartilharem medos, dúvidas, incertezas e alegrias ao longo do percurso, tornando essa caminhada mais leve e acolhedora.

Aos colegas do grupo de pesquisa, por dividirem seus conhecimentos e oferecerem apoio com palavras e atitudes, tornando a rotina laboratorial mais afável.

À professora Tigressa Rodrigues, pela generosidade em compartilhar seu tempo, ensinamentos e colaboração em experimentos, sendo exemplo de profissionalismo e dedicação.

Ao Allyson Ruan, pela receptividade ao abrir as portas de laboratórios essenciais à realização dos experimentos, contribuindo para a ampliação da minha rede de contatos profissionais.

À professora Raquel Petrilli e ao professor Josimar Eloy, pela disponibilidade e contribuição com seus conhecimentos e infraestrutura laboratorial.

Aos colaboradores cooperados, terceirizados e técnicos administrativos, pelo suporte e pela colaboração para a harmonia no ambiente departamental.

RESUMO

A Alcalase® é uma enzima proteolítica do tipo serino protease, com capacidade de degradar adesinas e biofilmes produzidos por algumas bactérias gram-negativas. Além disso, apresenta atividade hidrolítica sobre proteínas, sendo eficiente na quebra de ligações peptídicas. Apesar de ela apresentar notável atividade catalítica, sua aplicação na forma solúvel enfrenta desafios, como baixa estabilidade operacional e a susceptibilidade à desnaturação em ambientes com variações de pH ou na presença de solventes. Essas limitações comprometem sua viabilidade econômica em processos industriais. Neste contexto, a imobilização enzimática surge como uma estratégia eficaz para aprimorar a atividade e estabilidade da enzima em aplicações comerciais. O ácido poliacrílico, também conhecido como Carbopol, é um polímero biodegradável, biocompatível com a pele, não tóxico e estável, podendo ser utilizado na formulação de produtos farmacêuticos e como suporte para imobilização enzimática. Outras moléculas de interesse para imobilização incluem fenóis, taninos, flavonóides e terpenos, presentes no extrato comercial da *Punica granatum L.*, também conhecida como romã. Os polifenóis e taninos apresentam atividade antimicrobiana, enquanto flavonoides e terpenos exercem ação anti-inflamatória. A atividade antimicrobiana contribui para o tratamento de feridas infectadas, podendo acelerar o processo de cicatrização. Diante da crescente resistência a antibióticos sintéticos, este trabalho propõe a imobilização da enzima Alcalase® em Carbopol 996, com a incorporando o extrato de romã comercial no gel de Carbopol 996 produzido. Atualmente, o tratamento enzimático de feridas e o uso de extratos de plantas medicinais são empregados separadamente no processo de cicatrização. Assim, a combinação da imobilização da enzimática com a incorporação do extrato de romã representa uma estratégia inovadora. O presente estudo realizou ensaios de atividade enzimática, eletroforese, quantificação de fenóis totais, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), determinação do potencial zeta e análise de viscosidade. Apesar da presença de inibidores de protease presentes no extrato de romã, o bioproduto imobilizado manteve sua atividade enzimática $0,030 \pm 0,002$ U/mL no precipitado e $0,003 \pm 0,001$ U/mL no sobrenadante, indicando que o processo de imobilização foi bem-sucedido. Além disso, o extrato de romã preservou sua atividade fenólica após ser incorporado no gel de imobilização contendo a enzima. A análise por FTIR demonstrou que não houve perda dos principais grupos funcionais das substâncias utilizadas no processo de imobilização. A caracterização reológica indicou que o gel apresenta comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico. Portanto, o estudo alcançou seus objetivos ao realizar a imobilização da enzima e a incorporação do extrato de romã comercial no gel de Carbopol 996,

preservando as características essenciais de ambos os componentes. Os resultados sugerem que o bioproduto obtido possui potencial como alternativa no tratamento de feridas, embora sejam necessários ensaios adicionais para avaliar a liberação dos componentes ativos e sua eficácia cicatrizante.

Palavras-chaves: Alcalase®; imobilização enzimática; Carbopol 996; extrato comercial de romã; cicatrização de feridas; *Punica granatum*.

ABSTRACT

Alcalase® is a serine protease-type proteolytic enzyme capable of degrading adhesins and biofilms produced by some gram-negative bacteria. In addition, it has hydrolytic activity on proteins, being efficient in breaking peptide bonds. Although it has remarkable catalytic activity, its application in soluble form faces challenges, such as low operational stability and susceptibility to denaturation in environments with variations in pH

or in the presence of solvents. These limitations compromise its economic viability in industrial processes. In this context, enzyme immobilization emerges as an effective strategy to improve enzyme activity and stability in commercial applications. Polyacrylic acid, also known as Carbopol, is a biodegradable, skin-biocompatible, non-toxic and stable polymer that can be used in the formulation of pharmaceutical products and as a support for enzyme immobilization. Other molecules of interest for immobilization include phenols, tannins, flavonoids and terpenes, present in the commercial extract of *Punica granatum* L., also known as pomegranate. Polyphenols and tannins have antimicrobial activity, while flavonoids and terpenes have anti-inflammatory action. Antimicrobial activity contributes to the treatment of infected wounds and can accelerate the healing process. Given the increasing resistance to synthetic antibiotics, this work proposes the immobilization of the enzyme Alcalase® in Carbopol 996, incorporating the commercial pomegranate extract into the produced Carbopol 996 gel. Currently, enzymatic treatment of wounds and the use of medicinal plant extracts are used separately in the healing process. Thus, the combination of enzyme immobilization with the incorporation of pomegranate extract represents an innovative strategy. The present study performed enzymatic activity assays, electrophoresis, quantification of total phenols, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), determination of zeta potential and viscosity analysis. Despite the presence of protease inhibitors in the pomegranate extract, the immobilized bioproduct maintained its enzymatic activity 0.030 ± 0.002 U/mL in the precipitate and 0.003 ± 0.001 U/mL in the supernatant, indicating that the immobilization process was successful. In addition, the pomegranate extract preserved its phenolic activity after being incorporated into the immobilization gel containing the enzyme. FTIR analysis demonstrated that there was no loss of the main functional groups of the substances used in the immobilization process. The rheological characterization indicated that the gel presents non-Newtonian behavior of the pseudoplastic type. Therefore, the study achieved its objectives by performing enzyme immobilization and incorporation of commercial pomegranate extract into Carbopol 996 gel, preserving the essential characteristics of both components. The results suggest that the

bioproduct obtained has potential as an alternative in the treatment of wounds, although additional tests are needed to evaluate the release of the active components and their healing efficacy.

Keywords: Alcalase®; enzyme immobilization; Carbopol 996; commercial pomegranate extract; wound healing; *Punica granatum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ilustração das camadas da pele humana.....	24
Figura 2 –	Ilustração do tecido humano com injúria nas camadas da pele.....	25
Figura 3 –	Fases da cicatrização da pele humana.....	26
Figura 4 –	Ilustração da <i>Punica granatum L.</i> e da estrutura química da punicalagina presente na casca da romã.....	27
Figura 5 –	Ilustração da aplicação da formulação farmacêutica gel sobre uma pele lesionada.....	29
Figura 6 –	Etapas do processo de gelificação do Carbopol.....	30
Figura 7 –	Reação de neutralização do ácido poliacrílico.....	31
Figura 8 –	Mecanismo de ligação da enzima ao substrato e a liberação do produto da reação enzimática.....	32
Figura 9 –	Representação da estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de uma enzima.....	33
Figura 10 –	Representação de uma reação de hidrólise realizada por uma protease	34
Figura 11 –	Mecanismo de ação da exopeptidase e endopeptidase.....	35
Figura 12 –	Representação do duplo mecanismos de ação da enzima Alcalase®.....	37
Figura 13 –	Sistema de interação de cargas opostas do Carbopol contendo o grupo carboxílico negativo, enzima Alcalase® positiva e o extrato de <i>Punica granatum L.</i> negativo.....	39
Figura 14 –	Sistema de acionamento de liberação do ativo da parte de dentro do encapsulamento e de sua superfície pela ação mecânica.....	40
Figura 15 –	Efeito da temperatura na atividade da enzima Alcalase® durante a hidrólise de caseína a 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0. As atividades iniciais em absorbância	52

foram: 0,312 (30 °C), 0,276 (40 °C), 0,255 (50 °C), 0,175 (60 °C) e 0,202 (70 °C), sendo as atividade enzimática inicial no tempo de zero minuto de 0,000276 U/mL (30 °C), 0,000244 U/mL (40 °C), 0,000226 U/mL (50 °C), 0,000151 U/mL (60 °C) e 0,000178 U/mL (70 °C) A concentração de proteína foi mantida constante em $0,095 \pm 0,005$ mg/mL.....

Figura 16 – Efeito do aumento da concentração do substrato caseína de 0,1% a 1,3% m/v na hidrólise enzimática realizada pela enzima Alcalase®..... 56

Figura 17 – Trealose e polietilenoglicol e sua influência na atividade enzimática da Alcalase® durante hidrólise da caseína 2,5% a 37 °C e pH 5,5. Trealose 5% m/v. Alcalase 0,3% v/v. Extrato comercial de romã a 1% (Romã). Polietilenoglicol 5.800 0,1% m/v (PEG 5.800). Polietilenoglicol 6.000 0,1% m/v (PEG 6.000). Coluna na cor preta representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo..... 58

Figura 18 (a) – Trealose e polietilenoglicol e sua influência na estabilidade da atividade enzimática da Alcalase® imobilizada em Carbopol 996, com incorporação do extrato comercial de romã durante hidrólise da caseína 2,5% m/v. Resultados obtidos no precipitado a 37 °C e pH 5,5. Trealose 5% m/v. Alcalase® 0,3% v/v. Extrato de romã comercial 1% v/v (Romã). PEG 5.800 e PEG 6.000 a 0,1% m/v. Coluna na cor preta representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo..... 60

Figura 18 (b) – Trealose e polietilenoglicol e sua influência na estabilidade da atividade enzimática da Alcalase® imobilizada em Carbopol 996, com incorporação de extrato comercial de romã durante a hidrólise da caseína 2,5% m/v. Resultados obtidos no sobrenadante a 37 °C e pH 5,5. Trealose 5% m/v. Alcalase 0,3% v/v. Extrato de romã comercial 1% v/v. PEG 5.800 e PEG 6.000 a 0,1% m/v. Coluna na cor preta 61

	representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo.	
Figura 19 –	Atividade de hidrólise da caseína pela enzima Alcalase® solúvel, na presença e ausência do extrato de romã. Alcalase® 0,3% v/v e extrato de romã 1% v/v.....	62
Figura 20 –	Atividade de hidrólise da caseína pela enzima Alcalase® imobilizada, com e sem a incorporação do extrato comercial de romã na imobilização. Alcalase® 0,3% v/v, Carbopol 0,1% m/v e extrato de romã 1% v/v. Coluna na cor preta representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo.	64
Figura 21 –	Influência do aumento da concentração do suporte na atividade enzimática durante a hidrólise da caseína - Carbopol: 0,1% m/v; 0,2% m/v; 0,3% m/v. Enzima Alcalase®: 0,3% v/v. As colunas na cor preto mostram os valores no precipitado e em vermelho no sobrenadante.....	65
Figura 22 –	Carbopol 996 nas concentrações de 0,1% m/v, 0,2% m/V e 0,3% m/v..	66
Figura 23 –	Eletroforese SDS-PAGE – 1: Marcador de baixo peso molecular; 2: Enzima solúvel 0,30 mg/mL; 3: Amostra (Alcalase® 0,114 mg/ml com a incorporação do extrato comercial de romã 1% v/v e imobilizada em Carbopol 0,1% m/v; 4: Carbopol 0,1% m/v.....	68
Figura 24 –	Concentração de fenóis totais, expressa em µg equivalentes de ácido gálico, utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Alcalase 0,3% v/v, extrato de romã comercial 1% v/v, Carbopol 0,1% m/v. EAG: equivalentes de ácido gálico.....	69
Figura 25 –	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. 1 - FTIR do Carbopol a 0,1% m/v liofilizado; 2 - FTIR Alcalase® liofilizada a 0,3% v/v; 3 - FTIR do extrato comercial de romã liofilizado a 1% v/v; 4 - FTIR da imobilização em Carbopol 996 a	71

0,1% m/v com Alcalase® a 0,3% v/v com a incorporação de extrato
comercial de romã a 1% v/v.....

Figura 26 – Reograma do gel de Carbopol contendo enzima Alcalase® e extrato 75
comercial de romã.....

Figura 27 – Gráfico da curva de calibração do ácido gálico expresso em mg/mL.. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição das amostras utilizadas na determinação da atividade enzimática	42
Tabela 2 – Avaliação da atividade do extrato comercial enzimático da enzima Alcalase® na hidrólise de caseína se iniciando sem diluição e indo até 1/500 em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0.....	51
Tabela 3 – Produto da hidrólise da caseína quantificado em valores de absorbância média com o desvio padrão do tempo de incubação 10 a 20 minutos.....	54
Tabela 4 – Potencial zeta e tamanho de partículas.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
3.1	Pele.....	24
3.2	<i>Punica granatum L</i>	27
3.3	Formas farmacêuticas.....	28
3.4	Géis.....	28
3.5	Carbopol.....	30
3.6	Enzimas.....	32
3.7	Proteases.....	34
3.8	Alcalase®.....	36
3.9	Imobilização.....	37
3.10	Encapsulamento.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODO.....	41
4.1	Materiais.....	41
4.2	Métodos.....	41
4.2.1	<i>Ensaio preliminar</i>	41
4.2.1.1	<i>Determinação das condições experimentais para medição da atividade enzimática</i>	41

4.2.1.1.1	Atividade enzimática.....	41
4.2.1.1.2	Diluição do extrato comercial da enzima Alcalase®.....	43
4.2.1.1.3	Estabilidade térmica.....	43
4.2.1.1.4	Tempo de incubação ideal para o protocolo de atividade enzimática.....	44
4.2.1.1.5	Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática.....	44
4.2.2	<i>Preparo de soluções para promover a estabilização da enzima frente ao extrato de romã.....</i>	44
4.2.2.1	<i>Solução de Alcalase® e Polietilenoglicol 5.800.....</i>	44
4.2.2.2	<i>Solução de Alcalase®, polietilenoglicol 5.800 e extrato de romã comercial a 1%.....</i>	45
4.2.2.3	<i>Solução de Alcalase®, PEG 5.800 e Carbopol 0,1%.....</i>	45
4.2.2.4	<i>Solução de Alcalase®, PEG 5.800, Carbopol 0,1% e extrato de romã comercial a 1%.....</i>	45
4.2.2.5	<i>Soluções contendo polietilenoglicol 6.000 e açúcar trealose.....</i>	46
4.2.3	<i>Efeito do extrato de romã na atividade enzimática e preparação do gel base de Carbopol 996 0,6% m/v para imobilização da enzima Alcalase® e incorporação do extrato comercial de romã.....</i>	46
4.2.3.1	<i>Efeito do extrato comercial de romã sobre a enzima solúvel.....</i>	46
4.2.3.2	<i>Preparação do gel base de Carbopol 996 a 0,6% m/v.....</i>	46
4.2.3.3	<i>Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 0,1% m/v.....</i>	47
4.2.3.3.1	<i>Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 a 0,1% m/v em 25 mL de água ultrapura.....</i>	47
4.2.3.3.2	<i>Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 0,1% m/v para volume final de 50 mL.....</i>	47

4.2.3.4	<i>Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 a 0,1% m/v com incorporação do extrato comercial de romã (volume final de 50 mL).....</i>	47
4.2.4	<i>Influência da concentração do gel de Carbopol 996 na atividade da enzima.....</i>	48
4.2.5	<i>Eletroforese SDS-PAGE.....</i>	48
4.2.6	<i>Concentração de fenóis totais.....</i>	48
4.2.6.1	<i>Construção da curva de calibração com ácido gálico.....</i>	49
4.2.6.2	<i>Análise das amostras.....</i>	49
4.2.7	<i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). ..</i>	49
4.2.8	<i>Determinação do potencial zeta.....</i>	50
4.2.9	<i>Análise reológica.....</i>	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Ensaio preliminares.....	51
5.1.1	<i>Determinação das condições experimentais para medição da atividade enzimática.....</i>	51
5.1.1.1	<i>Diluição da enzima comercial.....</i>	51
5.1.1.2	<i>Estabilidade térmica a diferentes temperaturas.....</i>	52
5.1.1.3	<i>Tempo de incubação ideal para o protocolo de atividade enzimática.....</i>	54
5.1.1.4	<i>Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática.....</i>	56
5.1.2	<i>Substâncias para promover a estabilização da enzima frente ao extrato de romã.....</i>	57
5.1.3	<i>Efeito do extrato de romã na atividade enzimática e preparação do gel base de Carbopol 996 0,6% para a imobilização da enzima Alcalase® e incorporação do extrato comercial de romã.....</i>	62

5.1.3.1	<i>Efeito do extrato de romã na enzima solúvel.....</i>	62
5.1.3.2	<i>Efeito do extrato de romã na enzima imobilizada e com incorporação do extrato comercial de romã na imobilização.....</i>	63
5.1.4	<i>Influência da concentração do gel de Carbopol.....</i>	65
5.2	Eletroforese SDS-PAGE.....	68
5.3	Concentração de fenóis totais.....	69
5.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	70
5.5	Determinação do potencial zeta.....	73
5.6	Análise reológica.....	74
6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE.....	88

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que ocorram, anualmente, 4.511 cirurgias a cada 100.000 mil habitantes no mundo, o que indica que 1 em cada 22 pessoas se submete a um procedimento cirúrgico por ano. A taxa de infecção associada a essas cirurgias varia de 1,9% a 40% , representando um impacto significativo tanto nos custos hospitalares e impactando tanto financeiramente quanto na qualidade de vida dos enfermos. No contexto hospitalar, calcula-se que as infecções em feridas sejam responsáveis por cerca de 4% do total dos gastos institucionais (Gillespie *et al.*, 2020).

No Brasil, as infecções em feridas cirúrgicas são classificadas como infecções relacionadas à assistência à saúde, ocupando o terceiro lugar em frequência, atrás apenas das infecções urinárias e respiratórias. Elas correspondem de 14 a 16% das causas de hospitalizações e podem apresentar resistência a antibióticos, o que reforça a necessidade de novas abordagens terapêuticas (Câmara *et al.*, 2022).

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, originando peptídeos ou aminoácidos livres, podendo ser utilizadas em tratamento de feridas por promoverem o desbridamento de tecidos necrosados. A enzima proteolítica papaína, por exemplo, já é amplamente utilizada nesse contexto devido ao grupo tiol ligado à cisteína-25, responsável pela ação proteolítica. Além disso, apresenta propriedades bacteriostáticas, bactericidas e anti-inflamatórias (Leite *et al.*, 2020).

Outra enzima de destaque é a Alcalase®, produzida pelo *Bacillus licheniformis*, também pertencente à classe das proteases. Essa enzima apresenta dois mecanismos de ação relevantes: o primeiro é a degradação de biofilme de bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, por meio da clivagem de substâncias poliméricas extracelulares de bactérias; o segundo envolve a quebra de adesinas bacterianas, estruturas que dificultam o processo de cicatrização. A Alcalase® também se destaca por sua resistência térmica, tornando-se um biocatalizador de interesse em pesquisas (Weldrick *et al.*, 2019).

Além das enzimas, as plantas medicinais também são amplamente empregadas no tratamento de feridas, devido às suas propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes. Um exemplo é *Punica granatum L.*, conhecida popularmente como romã, cujo extrato contém compostos fenólicos com capacidade de neutralizar radicais livres, contribuindo positivamente para o processo cicatricial (Jacob, 2018). Tanto enzimas quanto extratos vegetais podem ser incorporadas em formulações farmacêuticas, sendo o gel uma forma farmacêutica de gel amplamente utilizada nesse contexto (Aulton, 2016).

Os géis possuem a vantagem de não causar irritação ao tecido em processo de injúria, não induzir dor adicional, apresentar boas propriedades reológicas, capacidade tamponante, serem inertes em condições fisiológicas, atóxicos, estáveis termicamente e capazes de permanecer por longos períodos no local de aplicação. Como desvantagem dessa forma farmacêutica, destaca-se a baixa capacidade de absorção do exsudado de feridas, a possível geração de odor desagradável em casos de infecção, além do risco de proliferação bacteriana em formulações aquosas, especialmente quando não são utilizados conservantes adequados ou quando há falhas nas condições de armazenamento (Gratieri *et al.*, , 2008). No entanto, quando formulado com agentes gelificantes, e sob boas práticas de fabricação, o risco de contaminação microbiológica é minimizado, uma vez que o pH da formulação pode ser ajustado para dificultar sua proliferação, além de alguns agentes terem propriedade antibacteriana (Rumon *et al.*, 2024).

Os géis têm sido amplamente estudados e utilizados em formulações farmacêuticas destinadas a diferentes vias de administração, especialmente a tópica, devido à capacidade de promover a liberação rápida do fármaco e aumentar a biodisponibilidade do princípio ativo na pele – Neste contexto, o Carbopol destaca-se como um dos polímeros que são empregados na fabricação de géis, sendo considerado um agente espessante eficiente e versátil (Aulton, 2016).

O Carbopol é um polímero que contém grupos carboxila (-COOH) com caráter aniônico, capazes de interagir por atração eletrostática com a enzima Alcalase®, que apresenta caráter catiônico em pH neutro, considerando seu ponto isoelétrico de aproximadamente ~9,0 (Weldrick *et al.*, 2019). Essa interação favorece a adsorção da enzima, promovendo sua imobilização de forma estável.

Além disso, o extrato comercial de romã, rico em compostos fenólicos, contém grupos hidroxilas (-OH) que podem se ionizar em meio aquoso (Abrantes, 2016). A estrutura polimérica do Carbopol permite a formação de ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostática com essas e outras moléculas presentes em seu meio, favorecendo também a incorporação eficiente do extrato no gel (Weldrick *et al.*, 2019).

A utilização conjunta da enzima e do extrato em um mesmo suporte é estratégica, pois evita a aplicação separada dos dois componentes, o que poderia comprometer a eficácia ou a praticidade do sistema final. A imobilização no Carbopol, além de facilitar a manipulação e a aplicação tópica, permite um controle mais eficiente da liberação dos ativos, promovendo uma ação sinérgica.

Optou-se pelo uso do Carbopol 996 como agente espessante e suporte devido às suas propriedades reológicas favoráveis, biocompatibilidade, capacidade de formar géis estáveis e versatilidade em interagir com moléculas ativas (Aulton, 2016).

O Carbopol ainda se destaca como agente espessante para géis devido à sua alta eficiência em baixas concentrações, estabilidade microbiológica, capacidade de formar géis transparentes e excelente controle reológico. Essas características o tornam uma escolha preferencial em formulações que exigem estabilidade, estética e desempenho superior (Aulton, 2016). Embora outros agentes espessantes, como o alginato de sódio, também sejam uma opção natural e amplamente utilizada, suas limitações em termos de estabilidade frente a variações iônicas e susceptibilidade à biodegradação podem comprometer a eficácia e a durabilidade do produto final. Diante do exposto, surge a necessidade de produzir opções terapêuticas menos onerosas como a forma farmacêutica de gel (Dong *et al.*, 2025).

Neste sentido, o presente trabalho apresenta uma proposta inovadora ao utilizar o Carbopol 996 não apenas como agente espessante, mas também como suporte para a imobilização da enzima Alcalase® por adsorção, aproveitando suas propriedades estruturais e eletrostática para estabilização da enzima. Além disso, a incorporação simultânea do extrato vegetal comercial de romã ao sistema gelificado permite a criação de uma formulação multifuncional, com potencial aplicação tópica e ação sinérgica entre os ativos. A proposta é inédita ao reunir, em uma mesma matriz, compostos biotecnológicos e naturais, oferecendo um sistema versátil, estável e de fácil aplicação, com potencial promissor para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos voltados ao tratamento de feridas.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a imobilização da enzima Alcalase® em gel de Carbopol 996 contendo extrato comercial de romã, com foco na avaliação das características físico-químicas dessa formulação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Imobilizar a enzima protease Alcalase® em Carbopol 996, incorporando extrato comercial de romã, com o propósito de desenvolver um bioproduto com potencial aplicação nas indústrias farmacêuticas.

2.2 Objetivos específicos

- o Caracterizar o extrato enzimático, com base em sua atividade e estabilidade;
- o Quantificar a concentração dos fenóis totais no extrato comercial de romã;
- o Avaliar o efeito inibitório do extrato comercial de romã na enzima Alcalase®, nas formas solúvel e imobilizada;
- o Realizar a imobilizar da enzima Alcalase®;
Incorporar o extrato comercial de romã comercial no gel de Carbopol 996;
- o Determinar a atividade enzimática da enzima Alcalase® imobilizada em Carbopol 996, com e sem a presença extrato comercial de romã;
- o Identificar os principais grupos funcionais das substâncias estudadas, com e sem a imobilização, por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- o Avaliar o potencial zeta das substâncias, a fim de compreender a magnitude das suas cargas superficiais;
- o Analisar o comportamento reológico do gel obtido ao final do processo.

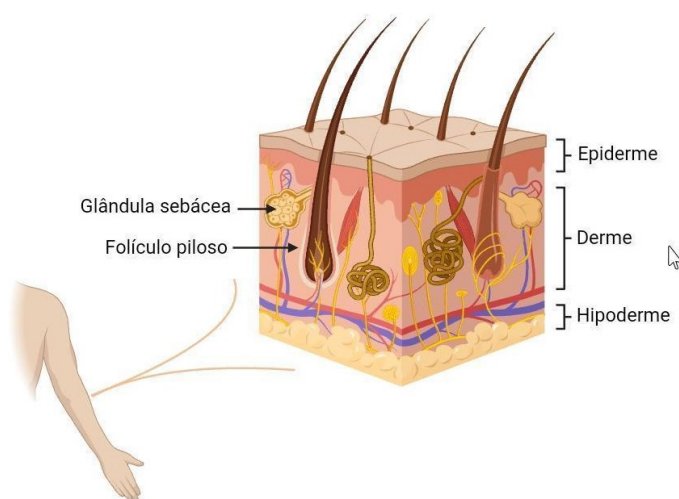
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Pele

A pele humana atua como barreira de proteção contra bactérias, toxinas, perda de líquidos e contribui para o controle da temperatura corporal. Além disso, pode ser utilizada como uma via de administração de fármacos, apresentando como uma de suas vantagens evitar o metabolismo de primeira passagem. Isso significa que a substância ativa não sofre uma diminuição em sua concentração, nem é transformada em um metabólito mais ativo do que a molécula original, por não passar pelo sistema porta hepático. Dessa forma, é possível entregar uma quantidade maior de fármaco à corrente sanguínea (Katzung *et al.*, 2010).

A pele é uma membrana complexa com múltiplas camadas, composta por epiderme, derme e hipoderme, Figura 1. Possui estruturas anexas, como folículos pilosos e glândulas sebáceas. As glândulas sebáceas têm a função de secretar sebo junto aos folículos pilosos. O sebo é constituído por triglicerídeos, ácidos graxos e ceras, e tem a finalidade de lubrificar a pele, mantendo seu pH em torno de 5 na superfície da pele. Essas camadas e anexos devem ser permeados para que o medicamento possa alcançar a circulação sistêmica e, assim, atingir seu sítio alvo (Katzung *et al.*, 2010).

Figura 1 - Ilustração das camadas da pele humana



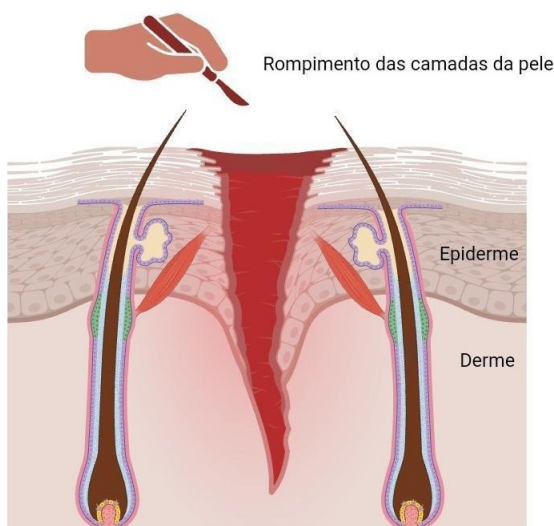
Fonte: Elaborada pela autora

O ponto isoelétrico da pele encontra-se entre 4,0 a 4,5. Em faixas de pH acima dessa, os carboxilatos associados aos resíduos de aminoácidos presente na superfície da pele ficam ionizados, o que a torna carregada negativamente. Esse fato favorece o transporte de cátions e dificulta o transporte ânions quando em contato com soluções de pH fisiológico (Gratieri *et al.*, 2008).

Uma das formas de transpor as barreiras da pele é por meio da liberação transdérmica de fármacos, cujo objetivo é conservar o princípio ativo e o disponibilizá-lo à circulação sistêmica ao permear as camadas da pele (Aulton *et al.*, 2016).

Um tecido que sofreu processo de injúria Figura 2 pode ter suas funções de controle térmico e de barreira contra agentes patogênicos, toxinas e fatores ambientais comprometidas. Os danos ao tecido podem ser classificados de acordo com seu agente causal, profundidade, aparência, etiologia (ulcerativa, cirúrgica ou traumática), tempo do ferimento (agudo ou crônico), grau de contaminação do ferimento (limpo, potencialmente contaminado, contaminado ou infectado) e grau de abertura. As técnicas de curativos e os medicamentos voltados a cada fase da cicatrização vêm avançando, e cabe ao profissional da enfermagem definir a melhor forma de cuidado (Sousa *et al.*, 2020).

Figura 2 - Ilustração do tecido humano com injúria nas camadas da pele



Fonte: Elaborada pela autora

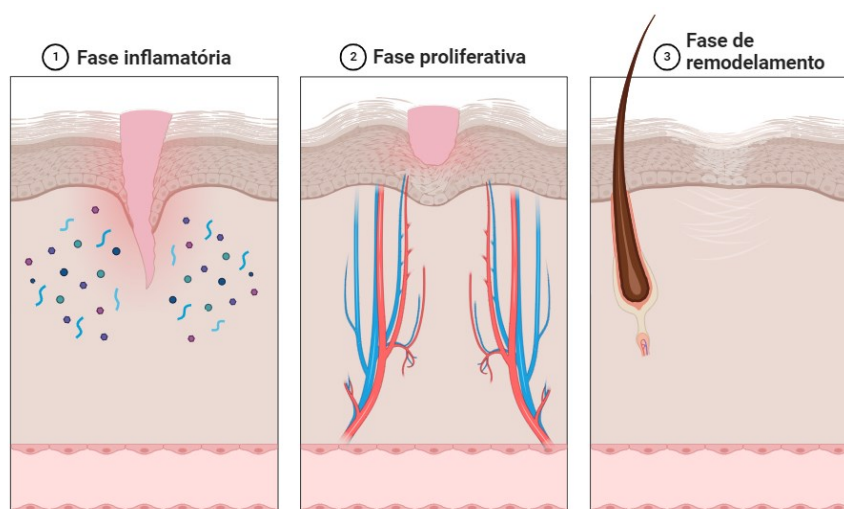
Para nortear a escolha da forma farmacêutica adequada ao tratamento de feridas, algumas características devem ser consideradas, como a presença ou ausência de exsudato (líquido contendo células ou outras substâncias celulares eliminadas dos vasos sanguíneos ao tecido inflamado), temperatura da pele e a presença de partículas no ferimento. Isso permite

manter um ambiente propício à reparação do tecidual. Recomenda-se remover o excesso de exsudato, manter a umidade na interface ferida/cobertura, garantir isolamento térmico com troca gasosa, proteger contra infecções por meio de tratamento adequado permitindo a troca gasosa do tecido, gerar proteção contra infecção com a utilização de um tratamento adequado — como a utilização de géis cicatrizante —, e retirar partículas ou contaminantes sem causar mais traumas ao tecido injuriado (Sousa *et al.*, 2020).

A cicatrização da pele passa por três fases: inflamatória, de proliferação e de remodelamento, como demonstrado na figura 3. A fase inflamatória tem início no momento da injúria no tecidual, com a liberação de substâncias vasoconstritoras, como as prostaglandinas e tromboxano, pelas membranas celulares adjacentes. Também ocorre a formação do coágulo e o início da resposta inflamatória. Por volta do quarto dia após a lesão, inicia-se a fase proliferativa, composta por quatro processos: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Essa fase pode durar até cerca de duas semanas após o início da cicatrização (Ramalho *et al.*, 2018).

A última fase, o remodelamento, envolve a deposição organizada de colágeno, completando o fechamento da ferida (Ramalho *et al.*, 2018).

Figura 3 - Fases da cicatrização da pele humana



Fonte: Elaborada pela autora

Em alguns casos, o processo de cicatrização necessita da ação de medicamentos para ocorrer de forma mais rápida e completa. Podemos citar medicamentos queratolíticos, queratoplásticos, resolutivos, rubesfaciente, antissépticos, antimicrobianos e medicamentos

fitoterápicos com propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias e antibacterianas, devido à presença de substâncias ativas em sua constituição (Leite, 2018).

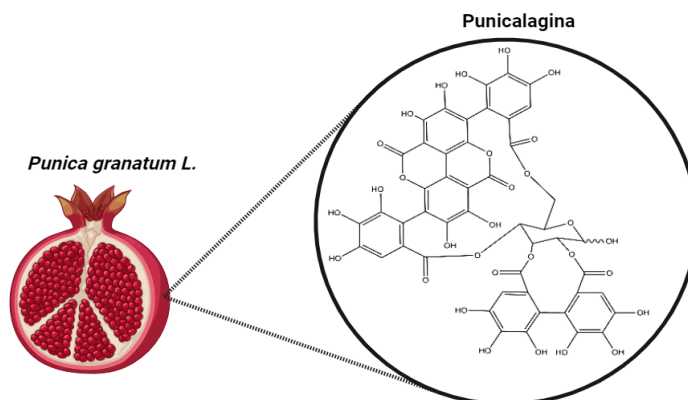
3.2 *Punica granatum L.*

Punica granatum L. é uma planta naturalizada no Brasil com propriedades fitoterápicas, conhecida popularmente também como romã (Brasil, 2021). Sua indicação de uso é para tratamentos em amigdalite, faringite e problemas de garganta em geral, possuindo em sua composição ativos com propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias. (BRASIL, 2020).

Sua atividade antimicrobiana deve-se à presença de polifenóis, que possuem ação contra bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*. A atividade anti-inflamatória é conferida pela presença de flavonóides, ácidos orgânicos, esteróis e triterpenos, que podem inibir a ativação de vias inflamatórias. A propriedade antioxidante da romã se deve à presença de compostos fenólicos que podem atuar na prevenção de processos oxidativos iniciados pela presença de radicais livres. O tanino elágico e a punicalagina também contribuem para a ação antimicrobiana do extrato de romã (Sousa *et al.*, 2018).

Na figura 4, tem-se a estrutura química da punicalagina um composto pertencente à classe dos taninos, presente na casca da romã, sendo um composto majoritário nos extratos da planta, com atividade antimicrobiana, antiviral, antiproliferativa, imunossupressora e antioxidante, podendo exercer ação contra algumas bactérias resistente a antibióticos (Paolini, 2023).

Figura 4 - Ilustração da *Punica granatum L.* e da estrutura química da punicalagina presente na casca da romã



Fonte: Adaptado (PAOLINI, 2023)

Os estudos apontam que diferentes grupos de flavonóides e taninos presentes no suco da romã podem inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de reduzirem a capacidade dos macrófagos de oxidar as lipoproteínas de baixa densidade, demonstrando sua atividade antioxidante (Sousa *et al.*, 2018).

A *Punica granatum L.* pode ser utilizada nas formas farmacêuticas de infusão, tintura e extrato (Brasil, 2021), podendo também ser incorporada em formulações farmacêuticas em forma de géis (Alam *et al.*, 2022).

3.3 Formas farmacêuticas

A ciência farmacêutica é utilizada para realizar o delineamento das formas farmacêuticas, desde a seleção do princípio ativo até a sua forma final para comercialização, trazendo benefícios para o usuário e ausência de toxicidades ao organismo (Aulton *et al.*, 2016).

Para a formulação de medicamentos, são utilizadas tecnologias para que sua liberação seja segura, eficaz, precisa e prática, considerando a forma de utilização, a doença a ser tratada, as possíveis vias de administração e a frequência da dosagem do medicamento (Aulton *et al.*, 2016).

Ao se formular um medicamento, deve-se conhecer as características do princípio ativo e dos excipientes que serão utilizados, além de suas propriedades em meio a solução, sua liberação e absorção pelo organismo. Outra observação a ser considerada é o tempo de início da ação e a via de administração, que pode ser oral, retal, parenteral, respiratória, nasal, auricular, ocular e tópica (Aulton *et al.*, 2016).

A via de administração tópica contempla as formas farmacêuticas: loções, soluções, unguentos, emplastros transdérmicos, aerossóis, espumas tópicas, cremes, pastas e géis (Aulton *et al.*, 2016).

3.4 Géis

Uma série de formulações farmacêuticas estão disponíveis no mercado para auxiliar no processo de cicatrização. As formulações de via tópica podem ser classificadas em líquidas, sólidas e semissólidas, sendo o gel classificado como semissólido (Aulton *et al.*, 2016).

Segundo o Formulário de Fitoterapia (2021), gel é uma forma farmacêutica semissólida podendo conter um ou mais princípios ativos, contendo um agente gelificante para

realizar o aumento da viscosidade na formulação. Podem estar presentes partículas do ingrediente farmacêutico ativo na faixa de 1 nm a 1 μ m, dispersas uniformemente ou em suspensão no meio. O gel ainda pode ser de caráter hidrofílico ou hidrofóbico e conter uma única fase, onde o princípio ativo está dissolvido, ou duas fases, nas quais um pó com característica microcristalina pode estar incorporado na formulação (Aulton *et al.*, 2016).

Os géis utilizados em feridas Figura 5 devem conseguir manter a hidratação equilibrada, ser absorventes e não aderir fortemente à pele, afim de evitar mais lesões. A utilização de gel não exclui a necessidade de um curativo secundário para complementar o tratamento (Aulton *et al.*, 2016).

Figura 5 - Ilustração da aplicação da formulação farmacêutica gel sobre uma pele lesionada



Fonte: Elaborada pela autora

Um exemplo de tipo de gel é o proveniente do polímero carboxivinílico (também conhecido como carbopol, ácido poliacrílico, polímero carboxivinílico, carbomer, carbómero, carboxipolimetileno, carpoleno), que possui característica aniônica, sendo amplamente estudado na área farmacêutica por apresentar boas propriedades de reológicas, podendo ser aplicado em vários locais do corpo por longos períodos. Além disso, possui capacidade tamponante, é inerte e atóxico (Gratieri *et al.*, 2008).

3.5 Carbopol

Carbopol é um polímero sintético de ácido poliacrílico, incolor e estável em pH entre 5,5 e 7,3. A formação desse polímero, Figura 6, ocorre pelo efeito de gelificação, conferindo por duas etapas: a primeira é a dispersão e hidratação do Carbopol em meio aquoso; a segunda etapa ocorre por meio da neutralização das cargas superficiais, pela adição de produtos neutralizantes (Brasil, 2021).

Figura 6 - Etapas do processo de gelificação do Carbopol



Fonte: Elaborada pela autora

O ácido poliacrílico possui em sua estrutura moléculas com grupos ionizáveis, denominados polieletrólitos. Os polieletrólitos são sistemas macromoleculares que apresentam uma fração relevante de cargas na cadeia principal no polímero. Eles podem ser classificados conforme o grau de dissociação, ou seja, a facilidade com que os seus grupos são ionizam. São considerados fortes quando se dissociam em toda a faixa de pH em sistemas aquosos e débeis quando se dissociam em intervalo restrito de pH, como no caso do Carbopol, que se dissocia pouco em meio ácido (Duarte, 2011).

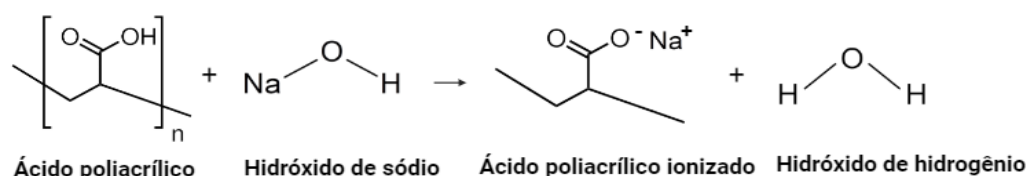
O grau de expansão do polieletrólito é determinado pelo seu grau de ionização, ocasionado pelas repulsões entre os grupos ionizados; em outras palavras o grau de expansão aumenta conforme o grau de ionização (Duarte, 2011).

O aumento da viscosidade e da transparência do Carbopol ocorre porque sua estrutura contém grupos ácidos que sofrem neutralização frente a substâncias orgânicas, como a trietanolamina, e inorgânicas, como o hidróxido de sódio, modificando os grupos ácidos para a forma de sal. Como consequência, há a expansão da cadeia do ácido poliacrílico e alteração do

pH do meio. A Figura 7 ilustra a reação de neutralização do ácido poliacrílico. Com o aumento do pH, os grupos carboxílicos, presentes na cadeia, são ionizados, provocando a hidratação do polímero. As cadeias iniciam sua expansão devido à repulsão eletrostática gerada pela ionização dos grupos ácidos, resultando na dissolução e aumento das dimensões da cadeia do ácido poliacrílico (Duarte, 2011).

A presença de metais monovalentes, bivalentes e trivalentes no meio após a neutralização, pode ocasionar a redução de pH, diminuindo a viscosidade. A alcalinização do meio pode gerar microgéis, o que resulta em um aumento da transparência das soluções (Duarte, 2011).

Figura 7 - Reação de neutralização do ácido poliacrílico



Fonte: Elaborada pela autora

A faixa estreita de pH para transformação do Carbopol em gel faz com que, em pH superior a 9,0, a adição de sais como cloreto de magnésio e cloreto de sódio à solução polimérica cause redução da viscosidade e da transparência. A viscosidade diminui com o aumento da concentração de sais, pois o polímero se transforma gradualmente em sua espécie não iônica, reduzindo a repulsão eletrostática entre as cargas e, conseqüentemente, diminuindo a expansão do polieletrólito. Ao se trabalhar com gel de carbopol, deve-se considerar os efeitos da desprotonação e da presença de sais, a fim de obter a viscosidade desejada (Duarte, 2011).

As propriedades conferidas aos polímeros o permitem que sejam conjugados com enzimas, possibilitando o aumento da meia-vida dessas biomoléculas. Essa proteção conferida por alguns tipos de polímeros ocorre porque, ao ficarem hidratados, seus filamentos promovem impedimento estérico, bloqueando e protegendo a enzima contra outras enzimas, proteínas e anticorpos que possam inativá-la, reduzindo sua taxa de degradação e depuração (Aulton *et al.*, 2016).

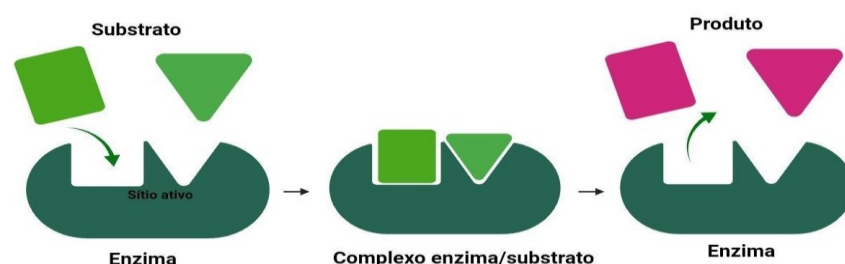
3.6 Enzimas

As enzimas são proteínas responsáveis por catalisar reações químicas no organismo e também podem ser utilizadas em processos industriais. Excluindo um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, todas as enzimas são proteínas. Para o seu funcionem adequadamente, é essencial que mantenham sua estrutura nativa, pois, quando desnaturada, degradada ou dissociada das suas subunidades, perdem a capacidade de catalisar reações (Nelson *et al.*, 2014).

As enzimas são classificadas segundo o tipo de reações que catalisam, distribuídas em seis classes principais, cada uma com suas subclasses. A classe 1 compreende a oxidorreductase, que realizam transferência de elétrons entre ligantes e a cadeia polipeptídica. A classe 2 inclui as transferases, responsáveis pela transferência de grupos químicos. A classe 3 é formada pelas hidrolases, que promovem reações de hidrólise — ou seja, realizam a quebra de ligações covalentes na presença de água. A classe 4 reúne as liases, que promovem clivagens de ligações carbono-carbono, carbono-oxigênio e carbono-nitrogênio, podendo também realizar outras ligações por eliminação ou adição de grupos. A classe 5 é composta pelas isomerases, que promovem a formação de isômeros pela transferência de grupos dentro da mesma molécula. Por fim, a classe 6 inclui as ligases, que formam ligações carbono-carbono, carbono-enxofre, carbono-nitrogênio e carbono-oxigênio por reações de condensação acopladas à hidrólise de adenosina trifosfato(ATP) (Nelson *et al.*, 2014).

A ação enzimática ocorre quando o substrato se liga ao sítio ativo da enzima. Este sítio contém resíduos de aminoácidos com cadeias laterais que realizam interações específicas com o substrato, resultando na formação do complexo enzima-substrato e, posteriormente, na liberação do produto. A Figura 8 ilustra esse mecanismo (Nelson *et al.*, 2014).

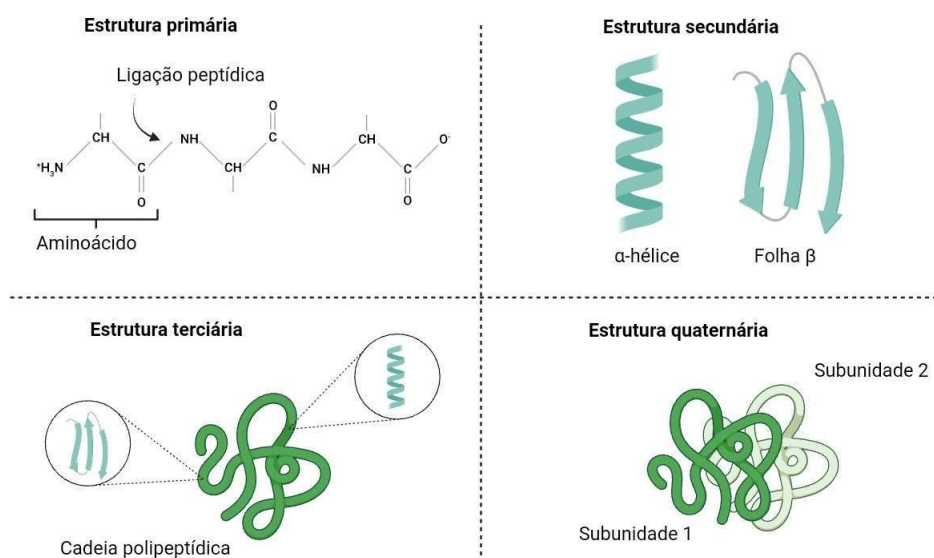
Figura 8 - Mecanismo de ligação da enzima ao substrato e a liberação do produto da reação enzimática



Fonte: Elaborada pela autora

As enzimas apresentam uma estrutura molecular complexa, composta por estrutura primária, secundária e terciária. Algumas apresentam também estrutura quaternária, que pode conter partes não proteicas, como carboidratos e lipídios (Denti, 2021). Na Figura 9 temos a representação da estrutura de uma enzima. A estrutura primária corresponde à sequência de aminoácidos ligados por ligações peptídicas, formados pelo grupo α -carboxila de um aminoácido com o grupo α -amino de outro aminoácido. A estrutura secundária resulta de ligações de hidrogênio entre os átomos de aminoácido adjacentes, formando arranjos como folhas β ou α -hélices. A estrutura terciária representa a conformação tridimensional da enzima, estabelecida pelas interações entre os grupamentos R dos aminoácidos. A estrutura terciária representa a conformação tridimensional da enzima, estabelecida pelas interações entre os grupamentos R dos aminoácidos distantes na cadeia polipeptídica. A estrutura quaternária, presente em algumas enzimas, corresponde à união de duas ou mais cadeias polipeptídicas(subunidade). Cada grupo enzimático possui características específicas de ligação que o tornam únicos, que fazem ser posteriormente ser classificados e subclassificação, possuírem propriedades únicas de especificidade, seletividade e biodegradabilidade (Nelson *et al.*, 2014)

Figura 9 - Representação da estrutura primária, secundária, terciária e quaternária de uma enzima



Fonte: Elaborada pela autora

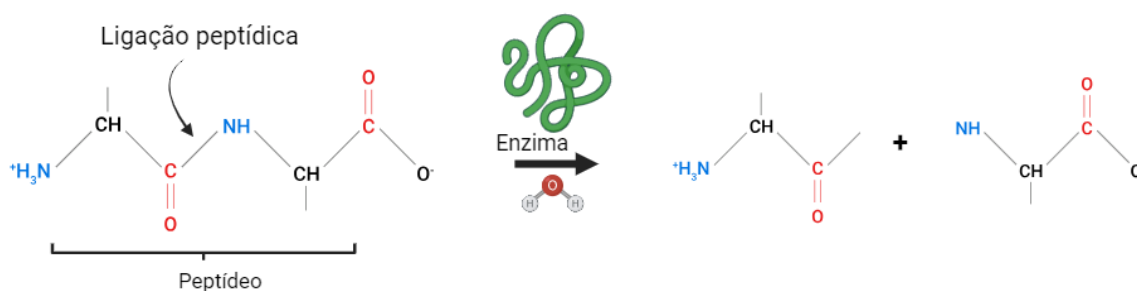
O mercado industrial das enzimas é segmentado em grupos como lipases, carboidrases, proteases, entre outras da classe das hidrolases. Essas enzimas têm ampla aplicação nas

indústrias alimentícias, cosméticas, químicas, farmacêuticas. Estima-se que o mercado global de enzimas cresça a uma taxa superior de 6% ao ano, entre 2022 e 2028, sendo a América do Norte o maior consumidor, com cerca de 30% de participação global (Intelligence, 2023).

3.7 Proteases

As proteases pertencem à classe das hidrolases e catalisam reações de hidrólise, como ilustrado na Figura 10. Elas atuam na hidrólise de diferentes ligações peptídicas em proteínas e em peptídeos envolvidos em processos fisiológicos, sendo uma reação de caráter irreversível, seletiva e específica (Amorim, 2018).

Figura 10 - Representação de uma reação de hidrólise realizada por uma protease

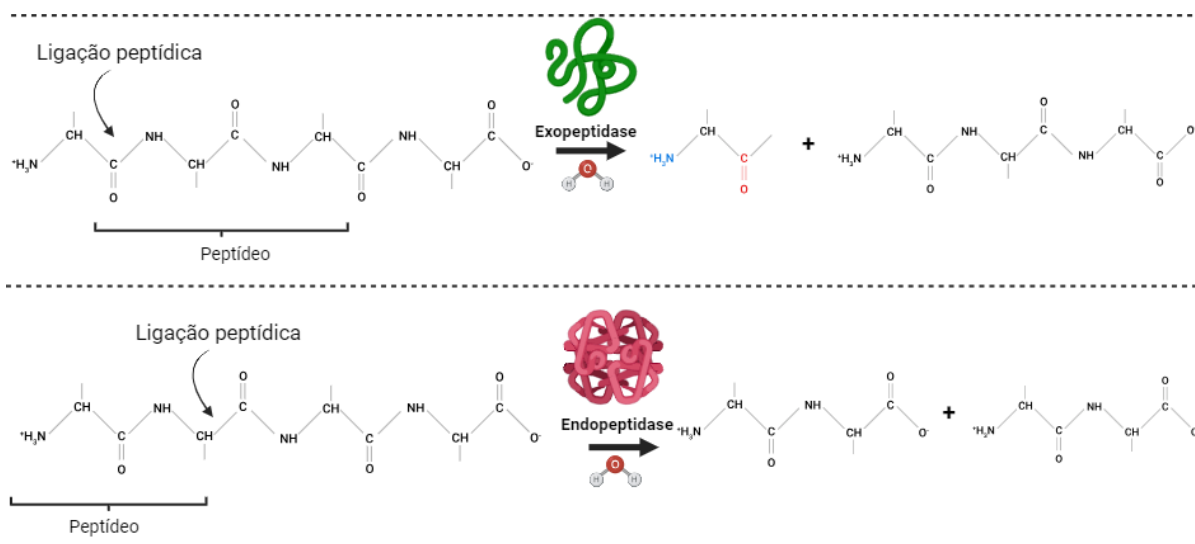


Fonte: Elaborada pela autora

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular classifica as proteases em seis famílias diferentes: serina proteases I, serino protease II, metalo protease I, metalo protease II, cisteína protease e a aspartil protease. Essa divisão é baseada nas propriedades elétricas e na especificidade pelo substrato (Giongo, 2006).

As proteases também são classificadas conforme o local de atuação em que promovem a quebra das ligações peptídicas do substrato. São chamadas endopeptidases quando a quebra ocorre longe dos grupos terminais, e exopeptidase quando a quebra ocorre nos grupos amino terminais ou carboxila. As exopeptidases podem ser classificadas como aminopeptidase, quando liberam resíduos N-terminal; ou carboxipeptidase quando liberam resíduos C-terminal. (Amorim, 2018). Na Figura 11, ilustra esses mecanismos.

Figura 11 - Mecanismo de ação da exopeptidase e endopeptidase



Fonte: Elaborada pela autora

As proteases exercem funções fisiológicas essenciais complexas e conduzir funções regulatórias do organismo vivos presentes em nosso planeta. A sua presença no meio extracelular, promove a hidrólise de proteínas e intracelularmente regula processos metabólicos. Devido a sua importância nos processos fisiológicos, podem ser obtidas de fontes animais, de plantas e de microrganismos — sendo esta última, em sua maioria, mais estáveis e de produção facilitada, podendo ter origem bacteriana, fúngica ou viral (Giongo, 2006).

As proteases bacterianas participam de diversos processos químicos, alimentícios e farmacêuticos, graças à sua alta atividade catalítica. O gênero *Bacillus spp.*, por exemplo, é empregado na fabricação de cerveja, queijos, adoçantes artificiais e medicamentos (Giongo, 2006; Amorim, 2018).

As proteases bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus spp.* produzem proteases extracelulares com atividade em faixa específica pH, podendo atuar em meios ácidos, neutros ou alcalinos (Giongo, 2006).

Na presença de inibidores, as enzimas proteolíticas bacterianas podem ter sua atividade reduzida ou mesmo inativada. Os inibidores podem ser irreversíveis, quando se ligam permanentemente à enzima, modificando sua estrutura ou sítio de ativo; ou reversível. Os reversíveis podem se ligar ao sítio ativo ou a outra região da cadeia polipeptídica, impedindo a ligação do substrato. Eles são classificados como competitivo, incompetitivo ou misto (Giongo, 2006).

A enzima Alcalase®, proveniente do *Bacillus licheniformis*, é classificada como serina protease II, do grupo das subtilisinas, sendo utilizada em indústrias alimentícias, químicas e

farmacêuticas (Giongo, 2006; Amorim, 2018).

3.8 Alcalase®

A enzima Alcalase® (CE 3.4.21.14), descoberta pela empresa farmacêutica Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca), é produzida por meio de fermentação submersa por *Bacillus licheniformis*. Sua principal aplicação está na preparação de diversos hidrolisados proteicos. Caracterizada como uma serina endopeptidase, a Alcalase® contém em sua composição uma subtilisina A (Amorim, 2018). Possui densidade de 1,25 g/mL, e sua atividade é expressa em Unidades Anson (AU), com atividade específica de 2,4 U/g. Sua massa molecular é de aproximadamente 27 kDa, conforme informações fornecidas pela empresa Merck. Para referência, uma unidade é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μ mol de L-tirosina de hemoglobina por minuto, a 25 °C e pH 7,5 (© 2023 Merck kgaa, 2023).

A Alcalase® é considerada uma serina endopeptidase, apresentando em sua estrutura a tríade catalítica clássica de aminoácidos: serina, aspartato e histidina (Polgár, 2005). Essa enzima mantém atividade eficiente à temperatura ambiente, em uma faixa de pH de 5 a 11, apresentando maior redução de atividade em valores ácidos do que em valores mais alcalinos. A Alcalase® também apresenta estabilidade em meios orgânicos como 2-metil-2-propanol e etanol, o que permite sua utilização em diversas reações (Tacias-pascacio *et al.*, 2020).

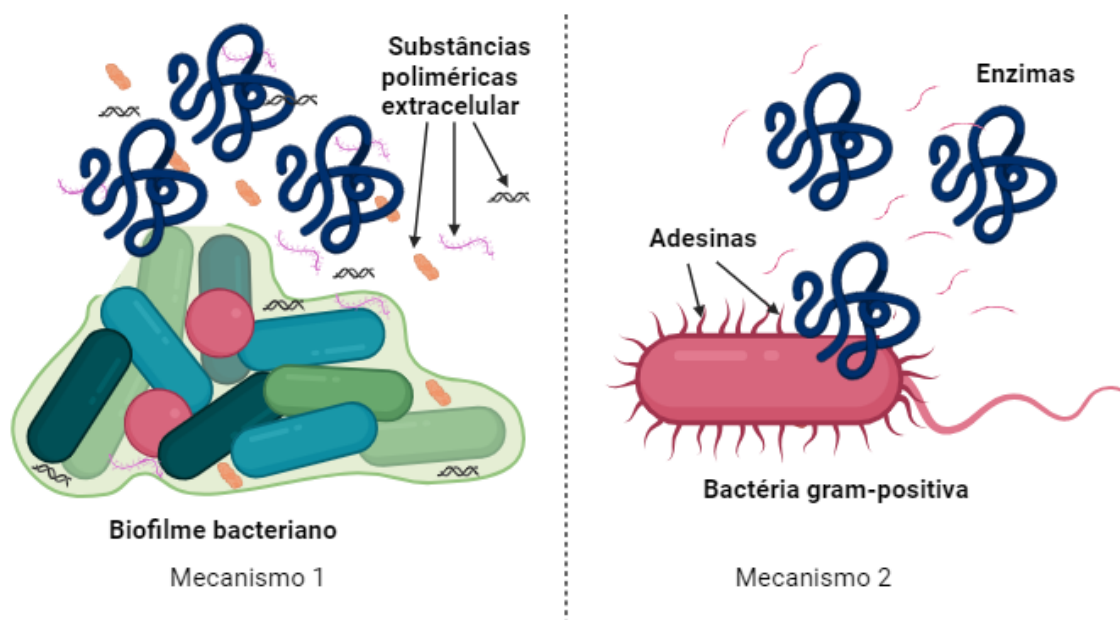
O sítio catalítico da Alcalase® possui resíduos com características nucleofílicas, capazes de se ligarem com facilidade a resíduos eletrofílicos doadores de prótons do substrato, formando ligações covalentes e gerando um intermediário covalente. Apresenta afinidade por substratos como cisteína, azocaseína, ácidos de α -L-aminoácidos e a proteínas da soja. Seu sítio ativo atua na quebra de ligações peptídicas de aminoácidos com resíduos hidrofóbicos, como preferência pela extremidade C-terminal, liberando resíduos carboxi-terminais hidrofóbicos, como serina, valina, leucina e histidina (Amorim, 2018).

A Alcalase® é uma proteína globular monomérica pequena, cujo sítio ativo se localiza na interface entre os domínios α e β de sua estrutura, demonstrando que conformação secundária da enzima é fundamental para sua atividade catalítica (Ma *et al.*, 2011).

Além de atuar nas indústrias químicas, alimentícias e têxtil, a Alcalase® também tem potencial de aplicação na indústria farmacêutica, podendo ser incorporada à formulações de medicamentos. Apresenta um duplo mecanismo de ação contra bactérias: o primeiro é a capacidade de degradar biofilmes bacterianos, promovendo a quebra das substâncias poliméricas extracelular; o segundo é a quebra de adesinas presentes na superfície de bacteriana,

impedindo a ligação das bactérias a tecidos lesionados do corpo humano, o que favorece o processo de cicatrização. Na Figura 12 apresenta a representação do duplo mecanismo de ação desta enzima. (Weldrick, 2019; Amorim, 2018).

Figura 12 - Representação do duplo mecanismos de ação da enzima Alcalase®



Fonte: Elaborada pela autora

3.9 Imobilização

As enzimas são biodegradáveis, biocompatíveis e derivadas de recursos renováveis. Sua utilização pode ocorrer sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, gerando menos resíduos e promovendo maior economia. São estáveis em pH fisiológico, seletivas e específicas nas reações que catalisam. No entanto, apresentam como desvantagem a instabilidade de sua atividade catalítica e térmica ao longo do tempo. Diante disso, surge a necessidade de tecnologias que promovam melhorias nesses aspectos. A imobilização enzimática visa atender a essas demandas, viabilizando sua aplicação prática e comercial por meio da ampliação da estabilidade térmica e da atividade enzimática durante sua utilização em processos industriais e formulações de produtos de uso prolongado (Sheldon *et al.*, 2013).

Os métodos de imobilização podem ser classificados como adsorção em suporte, encapsulamento em suporte, reticulação sem suporte e entre outros. O aprisionamento geralmente requer a síntese da matriz polimérica na presença da enzima. O suporte utilizado

pode ser um biopolímero, um polímero orgânico sintético ou um polímero inorgânico (Sheldon *et al.*, 2013).

Alguns polímeros apresentam mudanças conformacionais em resposta a estímulos químicos e/ou físicos e são denominados por polímeros inteligentes ou *smart polymers*. Os estímulos químicos ou internos incluem variação de pH, tipo de solvente, reconhecimento biológico ou enzimático, e reconhecimento químico. Já os estímulos físicos ou externos incluem temperatura, luz, corrente elétrica e campo magnético. (Vera *et al.*, 2020). Um exemplo de polímero inteligente responsivo à variação de pH é o ácido poliacrílico: com o aumento do pH, sua cadeia conformação colapsada se estende, adquirindo uma nova conformação (Yu *et al.*, 2024)

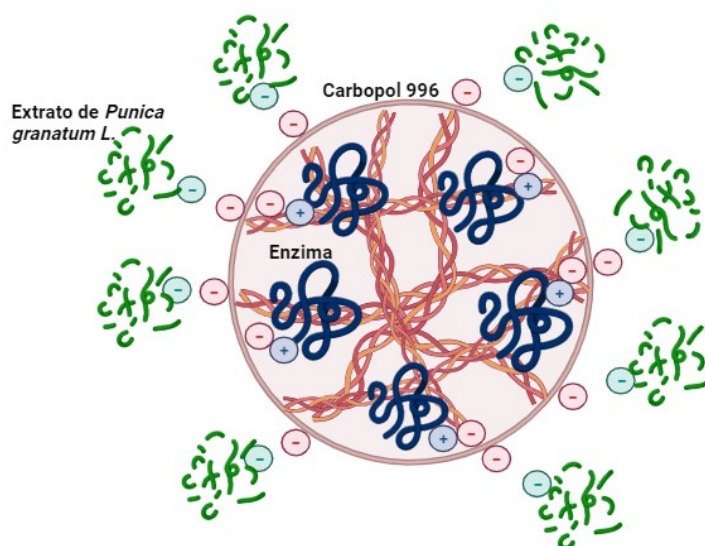
As enzimas podem ser imobilizadas em hidrogéis ou criogéis, naturais ou sintéticos. A secagem parcial de hidrogéis com diâmetros e espessura específicas, realizada à temperatura ambiente, pode gerar hidrogéis em forma de lente, conhecidos por *Lentikats*. Esses materiais apresentam estabilidade mecânica, facilidade de separação e resistência à degradação, sendo úteis no aprisionamento de biocatalisadores, incluindo células inteiras. As enzimas livres também podem ser utilizadas para a produção de *Lentikats* (Sheldon *et al.*, 2013).

3.10 Encapsulamento

O encapsulamento é uma técnica que cria uma camada protetora ao agente ativo, protegendo-o contra fatores externos que possam degradá-lo. Fatores que influenciam a escolha dessa técnica de imobilização incluem o local de aplicação do produto, as propriedades químicas, físicas, biológicas e físico-químicas tanto do ativo quanto do suporte da imobilização, além do mecanismo de liberação desejado para o ativo. Entre as vantagens, destaca-se a possibilidade de realizar uma liberação direcionada e controlada do ativo, possibilitando, o que pode aumentar a eficiência do produto e seu tempo de vida útil (Paolini, 2023).

O método da encapsulação pode ser realizado por meio da técnica de gelificação iônica, que consiste na formação de estruturas gelatinas com formato esférico, resultantes da interação entre cargas opostas do polieletrólito e do ativo, como representado na Figura 13 (Paolini, 2023).

Figura 13 - Sistema de interação de cargas opostas do Carbopol contendo o grupo carboxílico negativo, enzima Alcalase® positiva e o extrato de *Punica granatum L.* negativo

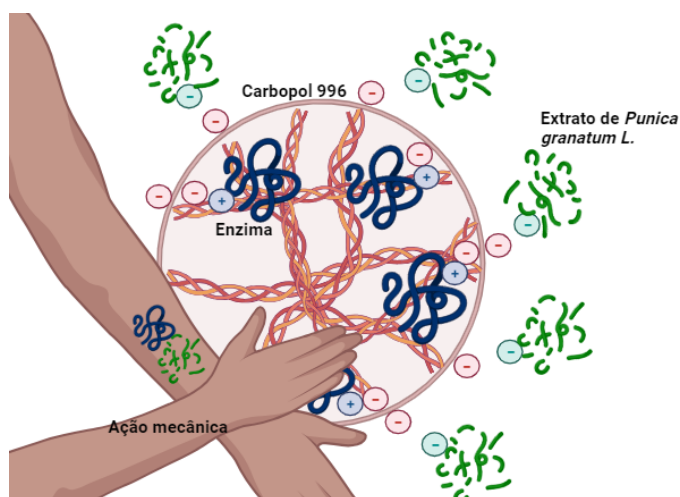


Fonte: Elaborada pela autora

Ao encapsular o material ativo, este deve permanecer no núcleo da cápsula formada, a fim de ser protegido contra as variações de temperatura, umidade, pH, radiação ultravioleta, além da evaporação de compostos voláteis (Paolini, 2023).

Para que o ativo seja liberado gradativamente no local desejado, é necessário conhecer as propriedades do encapsulante e as características físico-químicas do material ativo, permitindo o acionamento do sistema de liberação das cápsulas formadas. Esse sistema pode ser ativado por gatilhos, como temperatura, variação do pH, ação mecânica, difusão, entre outros mecanismos (Paolini, 2023). Na Figura 14, está representado o sistema de liberação do ativo encapsulado por meio do gatilho da ação mecânica.

Figura 14 - Sistema de acionamento de liberação do ativo da parte de dentro do encapsulamento e de sua superfície pela ação mecânica



Fonte: Elaborada pela autora

Um exemplo de agente com propriedade encapsulante são os géis derivados do ácido poliacrílico (Carbopol), por possuírem estruturas poliméricas capazes de carregar substâncias de interesse, como enzimas, em seus grupos funcionais, por meio de interações promovidas pelas forças de van der Waals, ligação de hidrogênio ou atração eletrostática. A possibilidade de o Carbopol apresentar tamanho reduzido, entre 20 a 200 nm, também contribui para uma excelente permeabilidade e responsividade a estímulos para a sua liberação (Weldrick *et al.*, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Neste trabalho, foi utilizado Carbopol 996 da empresa Ely Martins (São Paulo, Brasil). A enzima Alcalase® , uma protease derivada de *Bacillus licheniformis*, foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), com atividade mínima especificada de $\geq 2.4\text{U/g}$ de produto comercial, conforme informado pelo fabricante. O substrato caseína também foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

O extrato de romã foi comprado da empresa Néctar Plus (Crato, Brasil). Ácido gálico anidro puríssimo e a solução de Folin-Ciocalteu fenol 2M foram obtidos da empresa Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo). O hidróxido de sódio em micro pérola P.A., ácido tricloroacético P.A., fosfato de sódio bibásico anidro P.A., fosfato de sódio monobásico anidro P.A. foram adquiridos da empresa Neon Comercial (Suzano, Brasil). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e de diferentes marcas comerciais.

4.2 Métodos

4.2.1 Ensaios preliminares

4.2.1.1 Determinação das condições experimentais para medição da atividade enzimática

4.2.1.1.1 Atividade enzimática

O método utilizado para a determinação da atividade enzimática da enzima Alcalase® foi adaptado da literatura (Miranda, 2012; Weldrick *et al.*, 2019). As amostras consistiam em caseína a 2,5% m/v dissolvida em tampão TRIS-HCl (pH 8,0), que foram incubadas a 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se a enzima diluída ou as amostras descritas na Tabela 1, procedendo-se a uma nova incubação por mais 20 minutos a 37°C.

As reações foram interrompidas com ácido tricloroacético 5% m/v, seguida de centrifugação. O sobrenadante foi então misturado ao hidróxido de sódio 2 M e a absorbância foi medida a 280 nm no espectrofotômetro.

Um controle foi realizado da seguinte forma: tampão TRIS-HCl (pH 8,0) e enzima diluída (ou amostras) foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se ácido tricloroacético 5% m/v e, em seguida, o substrato (caseína a 2,5% m/v). A mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi tratado com hidróxido de sódio 2 M e a absorbância foi medida a 280 nm no espectrofotômetro.

A atividade enzimática foi calculada com base na equação adaptada Li *et al.*, (2024) e Pande *et al.*, (2006):

$$Atividade\ enzimática\left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{(Abs\ amostra - Abs\ controle) * Vt * df}{14150 * 1,0 * t * Vs}$$

Onde:

- Vt: Volume total (2,5 mL)
- Vs: Volume da amostra (0,02 mL)
- 14150: Coeficiente de extinção do número de resíduos de cisteína (M⁻¹*cm⁻¹)
- 1,0: Comprimento do caminho óptico (cm)
- t: tempo de reação (20 minutos)
- df: Fator de diluição

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima, sob as condições descritas, capaz de promover um aumento de 0,01 unidade de absorbância a 280 nm por minuto de digestão.

Tabela 1 – Descrição das amostras utilizadas na determinação da atividade enzimática

Número	Amostra
1	Alcalase® + Polietilenoglicol 5.800
2	Alcalase® + Polietilenoglicol 5.800 + Extrato de romã comercial
3	Alcalase® + Polietilenoglicol 5.800 + Carbopol base 0,6% m/v
4	Alcalase® + Polietilenoglicol 5.800 + Carbopol base 0,6% m/v + Extrato de romã comercial

- 5 Alcalase® + Polietilenoglicol **6.000**
- 6 Alcalase® + Polietilenoglicol **6.000** + Extrato comercial de romã
- 7 Alcalase® + Polietilenoglicol **6.000** + Carbopol base 0,6% m/v
- 8 Alcalase® + Polietilenoglicol **6.000** + Carbopol base 0,6% m/v + Extrato comercial de romã
- 9 Alcalase® + **2,5 mg de açúcar trealose**
- 10 Alcalase® + **2,5 mg de açúcar trealose** + Extrato comercial de romã
- 11 Alcalase® + **2,5 mg de açúcar trealose** + Carbopol base 0,6% m/v
- 12 Alcalase® + **2,5 mg de açúcar trealose** + Carbopol base 0,6% m/v + Extrato comercial de romã

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.1.1.2 Diluição do extrato comercial da enzima Alcalase®

A metodologia empregada para a determinação da atividade enzimática, descrita no item 4.2.1.1.1, foi modificada em relação às amostras utilizadas na realização deste ensaio. As amostras foram compostas pelo extrato enzimático comercial da Alcalase®, diluído de 1 até 1/500 (v/v) em tampão TRIS-HCl pH 8,0, mantendo-se o volume de 20 µL por amostra, à temperatura ambiente.

As leituras foram realizadas no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm, e a atividade foi reportada U/mL (Li *et al.*, 2024; Pande *et al.*, 2006).

4.2.1.1.3 Estabilidade térmica

A metodologia empregada para a determinação da atividade enzimática foi descrita no item 4.2.1.1.1, com a modificação da temperatura de incubação das amostras antes de serem adicionadas no protocolo de ensaio. As amostras (enzima solúvel diluída 1/400 v/v) foram previamente incubadas em temperatura variando de 30°C a 70°C.

Foram retiradas alíquotas a cada cinco minutos, durante um período total de 15 minutos, para a determinação da atividade da enzima.

O acompanhamento da atividade enzimática foi realizado considerando que a atividade residual a cada tempo foi expressa como percentual da atividade enzimática inicial, ou seja, a atividade relativa (Pessato, 2014).

4.2.1.1.4 Tempo de incubação ideal para o protocolo de atividade enzimática

A metodologia empregada para a determinação da atividade enzimática, descrita no item 4.2.1.1.1, foi modificada em relação ao tempo de incubação, que variou entre 10 a 20 minutos.

No controle, o tempo de incubação variou entre 20 a 30 minutos. Esse acréscimo de 10 minutos foi necessário porque, para cada tempo de incubação testado, a amostra foi previamente incubada como o substrato por 10 minutos antes da adição da enzima, momento em que se iniciava a hidrólise da caseína.

O acompanhamento da atividade enzimática foi realizado considerando a atividade residual em cada tempo, expressa como percentual da atividade enzimática inicial, ou seja, a atividade relativa (Pessato, 2014).

4.2.1.1.5 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

Para a determinação do efeito da concentração do substrato na atividade enzimática, foram utilizadas diferentes concentrações de caseína, mantendo-se constante a quantidade de enzima solúvel diluída 1/400 (v/v) em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0, conforme descrito no protocolo realizado no item 4.2.1.1.1.

Foi preparada uma solução de caseína a 5% m/v em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0. A partir dessa solução, foram retirados volumes correspondentes às concentrações finais de 0,1% (m/v) a 1,3% (m/v) para o volume final de 2 mL.

As leituras foram realizadas no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm, e a atividade enzimática foi expressa em U/mL (Li *et al.*, 2024; Pande *et al.*, 2006).

4.2.2 Preparo de soluções para promover a estabilização da enzima frente ao extrato de romã

4.2.2.1 Solução de Alcalase® e Polietilenoglicol 5.800

Pesou-se 50 mg de Polietilenoglicol (PEG) com massa molar média (Mn) de 5.800, que foi disperso em água ultra pura. Em seguida, adicionou-se à solução formada 150µL da enzima Alcalase® e completou o volume até 25 mL. O pH foi ajustado para 5,5 com solução de hidróxido de sódio 0,25 M. A solução permaneceu em repouso por 30 minutos, em temperatura ambiente e sem agitação, para permitir a formação de interações entre o PEG e a proteína. Após esse período, o volume foi completado para 50 mL e o pH novamente ajustado, se necessário. A solução final foi levada ao agitador tipo shaker, sob agitação de 110 rpm, a 37°C, por 30 minutos.

4.2.2.2 Solução de Alcalase®, polietilenoglicol 5.800 e extrato de romã comercial a 1%

Com base no procedimento descrito em 4.2.2.1, após o repouso inicial de 30 minutos para interação PEG-proteína, adicionou-se 0,5 mL de extrato comercial de romã. A seguir, o volume foi completado para 50 mL com água ultrapura, e o pH ajustado para 5,5. A solução foi então agitada por 30 minutos, a 110 rpm e 37°C.

4.2.2.3 Solução de Alcalase®, PEG 5.800 e Carbopol 0,1%

Após seguir os passos iniciais do item 4.2.2.1 para a preparação da solução de Alcalase® com PEG 5.800, preparou-se separadamente a solução base de Carbopol 0,6% m/v, pesando-se 8,33 g do polímero e dispersando-o em 15 mL de água ultrapura sob agitação (170 rpm, temperatura ambiente). A solução de PEG e Alcalase® foi então vertida sobre o gel de Carbopol, homogeneizada a 110 rpm em temperatura ambiente, completando-se o volume para 50 mL com água ultrapura. O pH foi ajustado para 5,5 e a solução final foi agitada em shaker por 30 minutos, a 110 rpm e 37°C.

4.2.2.4 Solução de Alcalase®, PEG 5.800, Carbopol 0,1% e extrato de romã comercial a 1%

Seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.2.2.3, preparou-se a solução de Alcalase® com PEG 5.800, que permaneceu em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e sem agitação. Simultaneamente, a base de Carbopol 0,6% m/v foi preparada dispersando-se 8,33 g em 15 mL de água ultrapura sob agitação a 170 rpm. Após a homogeneização, a solução contendo PEG e enzima foi cuidadosamente vertida sobre a solução de carbopol, sendo a mistura agitada a 110 rpm, em temperatura ambiente, por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, adicionou-se 0,5 mL do extrato de romã comercial. Em seguida, completou-se o volume final para 50 mL com água deionizada, verificando-se e ajustando-se o pH para 5,5 com solução de NaOH 0,25 M, se necessário.

4.2.2.5 Soluções contendo polietilenoglicol 6.000 e açúcar trealose

As soluções com PEG 6.000 e trealose seguiram os mesmos procedimentos descritos nos itens 4.2.2.1 a 4.2.2.4, substituindo-se o PEG 5.800 por PEG 6.000. Para as preparações com trealose, foram pesados 2,5 g do açúcar, que foi solubilizado em água ultrapura antes de ser incorporado às respectivas soluções.

4.2.3 Efeito do extrato de romã na atividade enzimática e preparação do gel base de Carbopol 996 0,6% m/v para imobilização da enzima Alcalase® e incorporação do extrato comercial de romã

4.2.3.1 Efeito do extrato comercial de romã sobre a enzima solúvel

Em 25 mL de água ultrapura, foram adicionados 150 µL de Alcalase®, com o pH ajustado para 5,5 utilizando solução de hidróxido de sódio 0,25 M, sob agitação a 100 rpm. Após 30 minutos, foram adicionados 500 µL de extrato comercial de romã e o volume foi ajustado para 50 mL. O pH foi novamente ajustado para pH para 5,5 com a mesma solução alcalina, mantendo-se agitado a 110 rpm. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 20 µL da amostra para a realização do ensaio da atividade enzimática, conforme descrito no item 4.2.1.1.1.

4.2.3.2 Preparação do gel base de Carbopol 996 a 0,6% m/v

A preparação do gel base foi realizada pesando-se 0,6 g de Carbopol 996, que foi transferido para um becker de vidro contendo 100 mL de água ultrapura. A mistura permaneceu em repouso por 24 horas. Após esse período, foi submetida à agitação no equipamento Ultra-Turrax, na velocidade 4, por 30 minutos. O pH da solução foi ajustado para 5,5 com solução de hidróxido de sódio 0,25 M, seguida de agitação a 250 rpm por 10 minutos.

4.2.3.3 Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 0,1% m/v

4.2.3.3.1 Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 a 0,1% m/v em 25 mL de água ultrapura

A imobilização da enzima Alcalase® foi realizada pesando-se 8,33 g do gel base de Carbopol a 0,6% m/v, ao qual foi adicionado água ultrapura até completar o volume de 25 mL. A mistura foi agitada a 110 rpm, sendo então adicionados 150 µL de Alcalase®. O pH foi ajustado para 5,5, utilizando solução de hidróxido de sódio 0,25 M. A solução foi incubada em shaker por 30 minutos, sob agitação a 110 rpm e temperatura de 37°C.

4.2.3.2.2 Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 0,1% m/v para volume final de 50 mL

Na imobilização descrita no item 4.2.3.2.1, foram adicionados 25 mL de água ultra pura para alcançar o volume final de 50 mL. O pH foi ajustado para 5,5 utilizando solução de NaOH 0,25 M.

Para a avaliação da atividade enzimática desta preparação, foi retirada uma alíquota de 2 mL, a qual foi centrifugada a 13.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de centrifugação e reservado. O precipitado resultante continha apenas o gel, agora compactado. Foram retiradas alíquotas de 20 µL de ambas frações para realização do ensaio de atividade enzimática, conforme descrito no item 4.2.1.1.1.

4.2.3.4 Imobilização da Alcalase® em Carbopol 996 a 0,1% m/v com incorporação do extrato comercial de romã (volume final de 50 mL)

Na solução contendo a enzima Alcalase® imobilizada, preparada conforme descrito no item 4.2.3.2.1, foram adicionados 500 µl de extrato comercial de romã. O volume foi então completado para 50 mL com água ultrapura. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,5 utilizando solução de NaOH 0,25 M e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos, a 37°C, 108 rpm, em shaker. Após este período, o pH foi reduzido para 5,5 com solução de HCl 0,25 M. Esse valor de pH foi selecionado por ser compatível com o pH da pele, além de favorecer a estabilidade da enzima e a eficiência da imobilização. A amostra foi agitada por mais 10 minutos, a 100 rpm.

Para a determinação da atividade enzimática, foi retirada uma alíquota de 2 mL, que foi centrifugada a 13.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um

microtubo de centrifugação e reservado. O precipitado continha gel compactado. Foram retiradas alíquotas de 20 µL de ambas as frações para a realização do ensaio de atividade enzimática, conforme descrito no item 4.2.1.1.1.

4.2.4 Influência da concentração do gel de Carbopol 996 na atividade da enzima

Foi utilizado o gel base produzido conforme descrito no item 4.2.3.1 para realizar o estudo do efeito do aumento da concentração do suporte na atividade da enzima.

Para preparar o gel de Carbopol 996 a 0,2% m/v, foram pesados 33,3 g do gel base a 0,6% m/v. Já para a preparação do gel a 0,3% m/v, foram utilizados 50 g do mesmo gel base. Após a pesagem, seguiu-se o protocolo de imobilização descrito para o gel a 0,1% m/v, conforme apresentado nos itens 4.2.3.2 e 4.2.3.3.

4.2.5 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese foi utilizada para a análise qualitativa de proteínas por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), empregando-se a metodologia de Laemmli (1970). O tampão de ruptura para desnaturação da enzima foi preparado conforme a metodologia proposta por Garcia-Galan *et al.* (2014).

Para a análise das amostras de enzimas imobilizadas e da enzima solúvel, foram utilizados 20 µL de amostra misturados com 20 µL de tampão de ruptura. A mistura foi incubada a 100 °C durante 10 minutos. Em seguida, uma alíquota de 12 µL de imediatamente aplicada em gel de poliacrilamida a 12 %.

A eletroforese foi realizada sob tensão constante de 110 V, utilizando uma célula tetra-Miniprotein (Biorad). Um marcador de proteínas de baixo peso molecular (14,4 - 97 kDa) foi utilizado como padrão. Ao término da corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250.

4.2.6 Concentração de fenóis totais

Para a quantificação dos fenóis totais, foi construída previamente uma curva de calibração com ácido gálico, seguido a metodologia descrita por Cheung, Cheung e Oi (2003).

4.2.6.1 Construção da curva de calibração com ácido gálico

A solução padrão com ácido gálico na concentração de 0,07 mg/mL foi diluída em 1 mL de etanol e posteriormente adicionada em 9 mL de água destilada, totalizando o volume de 10,0 mL.

Foram utilizados 11 tubos de ensaio, sendo adicionadas alíquotas de 0 a 0,5 mL da solução padrão e completado para o volume de 0,5 mL com adição de etanol a 10%. Os tubos foram tampados e reservados. No tempo zero, adicionou-se 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu em cada tubo, sendo agitado no vórtex. Após 3 minutos, foi adicionado em cada tubo 0,5 mL de solução de Na_2CO_3 saturado à mistura e completado o volume final de 5 mL com água destilada, agitando-se novamente no vórtex. Todos os tubos foram mantidos no escuro durante 90 minutos e lidos na absorbância de 725 nm (Cheung *et al.*, 2003).

O cálculo da curva padrão absorbância versus mg de ácido gálico/mL foi conduzido com valores de absorbância dentro da faixa linear do espectrofotômetro (0,1 - 1,0), tendo o coeficiente de regressão linear (R^2) obtido superior a 0,98, como demonstrado no Apêndice 1.

4.2.6.2 Análise das amostras

Para a determinação da concentração dos fenóis, foi utilizado 0,5 mL do sobrenadante e do precipitado realizado no item 4.2.3.3, referente a imobilização da Alcalase® e incorporação do extrato comercial de romã em Carbopol 996 a 0,1%.

O controle foi preparado com 0,5 mL de etanol a 10%. O controle positivo foi preparado com 0,5 mL da solução de ácido gálico.

Os tubos foram tampados e reservados. No tempo zero, adicionou-se 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu em cada tubo, sendo agitado no vórtice. Após 3 minutos, foi adicionado em cada tubo 0,5 mL de solução de Na_2CO_3 saturado à mistura e completado o volume final de 5 mL com adição de água destilada, agitando-se novamente no vórtice. Todos os tubos foram mantidos no escuro durante 90 minutos e lidos na absorbância do comprimento de onda de 725 nm (Cheung *et al.*, 2003).

4.2.7 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas seguindo a metodologia de Reis (2021), com adaptações, e foram conduzidas em espectrômetro de Infravermelho por Transformada de

Fourier utilizando um equipamento Cary 630 da Agilent Technologies. As amostras foram previamente liofilizadas a 76 mmHg a -96°C no liofilizador K108 e inseridas diretamente no espectrofotômetro. Os espectros de absorbância foram coletados com comprimento de onda na faixa de $650 - 4000\text{ cm}^{-1}$, com resolução espectral de 1 cm^{-1} e 32 scans.

4.2.8 Determinação do potencial zeta

Este ensaio foi utilizado para determinar o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas das amostras e seu potencial zeta. Foi utilizada a metodologia adaptada dos autores Weldrick, Hardman e Paunov (2019). A medição ocorreu a 25°C , usando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS. O potencial zeta foi medido utilizando uma cubeta de quartzo e uma célula de imersão ZEN1002, com um índice de refração de 1,50 e absorção de 0,001 com a diluição de 1:100 UFC em água ultrapura.

4.2.9 Análise reológica

O estudo da reologia foi realizado para identificar a resistência do gel formulado a um fluxo constante. Utilizou-se o viscosímetro Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer, acoplado a uma unidade de refrigeração SL-130 da Solab, na temperatura de 30°C . Esse equipamento permite medir eletronicamente a força de torção e convertê-la em viscosidade, gerando o resultado em milipascal (mPa.s). O ensaio foi realizado em triplicata utilizando 30 mL da amostra e um cilindro com o spindle LV3 63 submerso na amostra analisada, para medir a força necessária para superar a resistência à rotação. Foi utilizada a metodologia adaptada do autor Chorilli (2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio preliminares

5.1.1 Determinação das condições experimentais para medição da atividade enzimática

5.1.1.1 Diluição da enzima comercial

Para a determinação da atividade enzimática da Alcalase®, foi realizado o protocolo de ponto final utilizando como substrato a caseína. Inicialmente, o extrato enzimático comercial foi utilizado sem diluição. No entanto, a alta atividade enzimática não permitiu trabalhar sem diluição, uma vez que o valor de absorbância (Abs) obtido não estava em conformidade a Lei de Lambert-Beer, que prevê que as medições de absorbâncias devem ficar na faixa de 0,1 a 1. Vale ressaltar que extratos comerciais enzimáticos, mesmo contendo aditivos, podem sofrer com autocatálise (auto hidrólise), o que pode interferir nos resultados (Galo *et al.*, 2009).

Como podemos observar na Tabela 2, a diluição de 1/400 está dentro do intervalo recomendado pela lei de Lambert-Beer, com o valor de Abs de 0,328, mesmo considerando o erro experimental de 10%. Além disso, cabe destacar que, em nosso laboratório, opta-se por realizar o experimento dentro da faixa de absorbância de 0,2 a 0,8, visando garantir resultados mais confiáveis e seguros. O valor obtido na diluição de 1/400 também se encontra dentro desta faixa.

Tabela 2 - Avaliação da atividade do extrato comercial enzimático da enzima Alcalase® na hidrólise de caseína se iniciando sem diluição e indo até 1/500 em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0

Diluição	Absorbância 1	Absorbância 2	Atividade enzimática 1(U/mL)	Atividade enzimática 2 (U/mL)	Atividade Enz. Média (U/mL)
1	2,238	2,269	0,001	0,001	0,001±0,000

1/100	1,171	1,119	0,052	0,049	0,051±0,002
1/200	0,739	0,75	0,065	0,066	0,066±0,001
1/300	0,579	0,547	0,077	0,072	0,075±0,003
1/400	0,338	0,318	0,060	0,056	0,058±0,002
1/500	0,341	0,288	0,075	0,064	0,069±0,008

Fonte: Elaborada pela autora

A Tabela 2 mostra a relação entre a diluição da enzima Alcalase® e a atividade enzimática medida. Para as diluições mais altas, especialmente a amostra sem diluição e as diluições 1/100, as leituras de absorbância ultrapassaram o limite de 1,0, indicando que a enzima estava muito concentrada para gerar uma leitura precisa, de acordo com a Lei de Lambert-Beer. Isso comprometeria a linearidade da relação entre concentração e absorbância, o que é um ponto crítico em espectrofotometria.

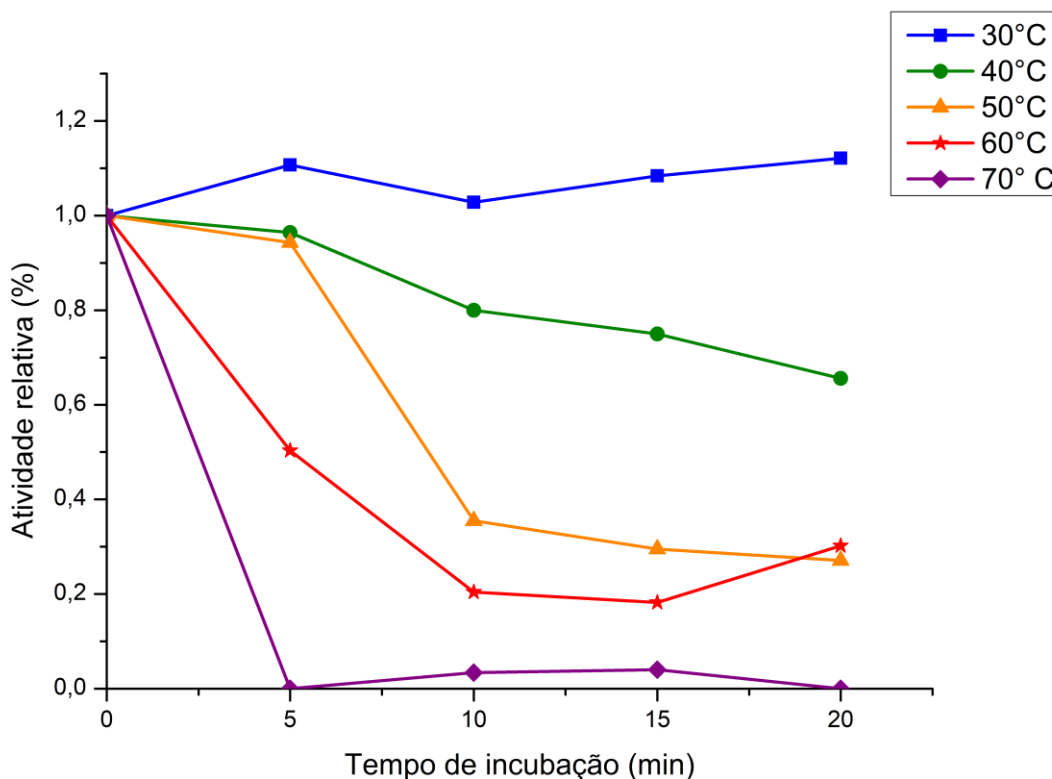
As diluições de 1/200 a 1/500 apresentaram valores de absorbância dentro da faixa recomendada, entre 0,1 e 1,0, com destaque para a diluição de 1/400, que apresentou a melhor conformidade com os valores esperados, com um valor médio de absorbância de 0,328, considerado adequado para a realização do experimento. A atividade enzimática média também seguiu um padrão esperado, com valores mais altos observados nas diluições mais baixas, e uma ligeira redução conforme o fator de diluição aumentava.

5.1.1.2 Estabilidade térmica a diferentes temperaturas

Para avaliar o efeito da temperatura na estabilidade da enzima Alcalase®, realizou-se um ensaio no qual a enzima foi previamente incubada a diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C) antes de ser adicionada ao substrato. Os resultados obtidos estão representados na Figura 15.

Figura 15 - Efeito da temperatura na atividade da enzima Alcalase® durante a hidrólise de caseína a 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0. As atividades

iniciais em absorbância foram: 0,312 (30 °C), 0,276 (40 °C), 0,255 (50 °C), 0,175 (60 °C) e 0,202 (70 °C), sendo as atividade enzimática inicial no tempo de zero minuto de 0,000276 U/mL (30 °C), 0,000244 U/mL (40 °C), 0,000226 U/mL (50 °C), 0,000151 U/mL (60 °C) e 0,000178 U/mL (70 °C). A concentração de proteína foi mantida constante em $0,095 \pm 0,005$ mg/mL.



Fonte: Elaborada pela autora

Observa-se na Figura 15 que, à temperatura de 30 °C, a enzima manteve 100% de sua atividade após 15 minutos de incubação, indicando ausência de desativação térmica nesse intervalo de tempo. À medida que a temperatura aumenta, verifica-se uma redução progressiva da atividade enzimática. Em 40 °C, embora haja uma diminuição da atividade, não foi possível determinar o tempo de meia-vida dentro dos 15 minutos avaliados. Já nas temperaturas de 50 °C e 60 °C, a meia-vida da enzima foi inferior a 10 minutos, evidenciando uma maior sensibilidade térmica. Notavelmente, a 70 °C, a enzima perdeu toda a sua atividade em menos de 5 minutos, indicando uma rápida desnaturação sob essa condição térmica.

A Figura 15 ilustra o perfil de estabilidade térmica da enzima Alcalase® frente a diferentes temperaturas. A manutenção da atividade enzimática a 30 °C sugere que essa temperatura é adequada para processos que requerem estabilidade prolongada da enzima. A redução da atividade com o aumento da temperatura indica uma maior taxa de desnaturação

térmica, comum em proteínas enzimáticas, devido à quebra de interações não covalentes que mantêm sua estrutura tridimensional. A perda completa de atividade a 70 °C em menos de 5 minutos destaca a limitação da enzima em processos industriais que operam em altas temperaturas, sendo crucial considerar essas características para aplicações tecnológicas que envolvam a Alcalase®.

5.1.1.3 Tempo de incubação ideal para o protocolo de atividade enzimática

Tabela 3 - Produto da hidrólise da caseína quantificado em valores de absorbância média com o desvio padrão do tempo de incubação 10 a 20 minutos

Amostra	Absorbância média em 10 minutos	Atividade enzimática média em 10 minutos (U/mL)	Absorbância média em 20 minutos	Atividade enzimática média em 20 minutos (U/mL)
Enzima a 36h a 25°C em água deionizada	0,116 ± 0,043	0,000102	0,109 ± 0,004	0,000048
Enzima a 36h a 25°C em carbopol 0,1%	0,096 ± 0,002	0,000085	0,121 ± 0,007	0,000054

Fonte: Elaborada pela autora

A Tabela 3 apresenta os valores médios de absorbância e atividade enzimática obtidos após 10 e 20 minutos de incubação para a enzima Alcalase® em suas formas solúvel e imobilizada. Observa-se que, para a enzima solúvel, a absorbância média foi de 0,116 ± 0,043 em 10 minutos e 0,109 ± 0,004 em 20 minutos, indicando uma leve diminuição na quantidade de produto formado ao longo do tempo. Em contrapartida, a enzima imobilizada apresentou um aumento na absorbância média de 0,096 ± 0,002 em 10 minutos para 0,121 ± 0,007 em 20 minutos, sugerindo que a imobilização pode ter causado um retardo na liberação do produto, possivelmente devido às limitações difusionais impostas pelo suporte. Esses resultados indicam que o tempo de incubação influencia de maneira distinta a atividade enzimática, dependendo da forma em que a enzima se encontra.

O tempo de incubação em protocolos de atividade enzimática desempenha um papel crucial, influenciando diretamente a interação entre a enzima e o substrato, seja em sua forma livre ou imobilizada. A variação desse parâmetro pode afetar significativamente a quantidade de produto gerado, impactando na eficiência da reação.

Na Tabela 3, observa-se que, para a enzima solúvel, os valores de absorbância média foi de $0,116 \pm 0,043$ após 10 minutos e $0,109 \pm 0,004$ após 20 minutos de incubação. Esses resultados indicam que a maior parte do produto foi formada nos primeiros 10 minutos, com uma leve diminuição ao longo do tempo, possivelmente devido à saturação do sistema ou à inativação parcial da enzima.

Por outro lado, a enzima imobilizada apresentou uma absorbância média de $0,096 \pm 0,002$ em 10 minutos, aumentando para $0,121 \pm 0,007$ em 20 minutos. Esse comportamento sugere que a imobilização pode ter causado um retardo na liberação do produto, possivelmente devido às limitações difusionais impostas pelo suporte, exigindo um tempo maior para atingir uma conversão semelhante à da enzima solúvel. Esse fenômeno é consistente com a literatura, que relata que a imobilização enzimática pode levar a alterações na cinética da reação devido a barreiras físicas à difusão do substrato até o sítio ativo da enzima (Illanes, 2008).

Ao comparar os resultados obtidos para ambas as formas da enzima, verifica-se que, em 10 minutos, a enzima solúvel produziu uma quantidade maior de produto em comparação à forma imobilizada. No entanto, após 20 minutos, os valores de absorbância tornaram-se semelhantes, indicando que, com um tempo de incubação adequado, a enzima imobilizada pode alcançar uma atividade comparável à da enzima solúvel.

Dessa forma, conclui-se que o tempo de incubação das amostras interfere nos resultados, sendo o tempo de 20 minutos considerado ideal tanto para a enzima em sua forma solúvel quanto imobilizada, respeitando a margem de erro experimental de 10%.

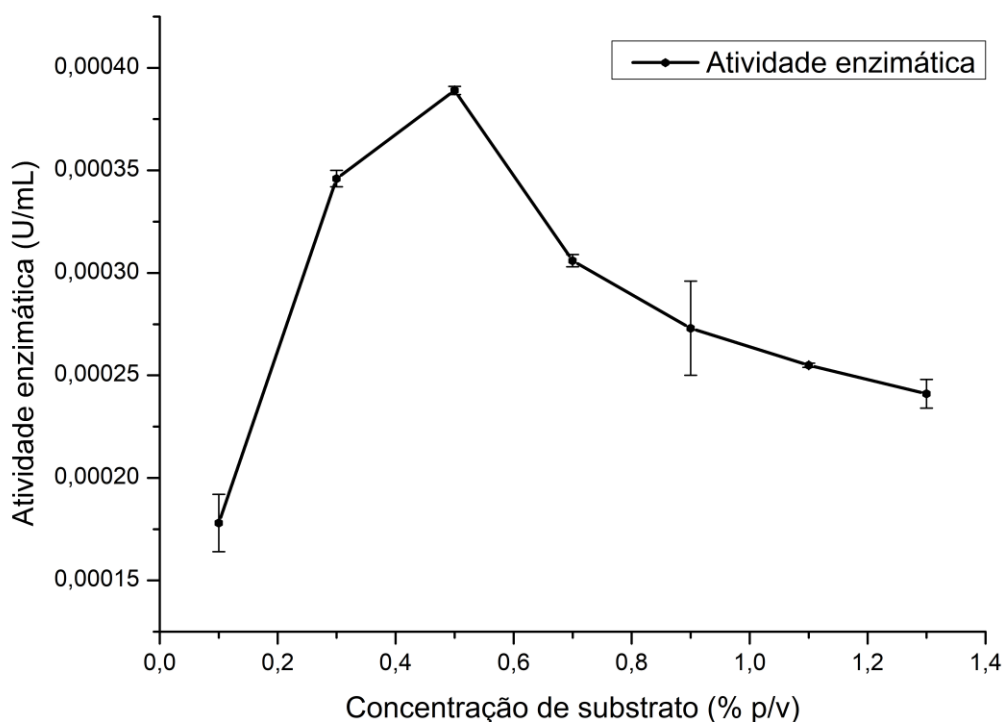
O tempo de 36 horas em temperatura ambiente para o início deste ensaio deve-se à necessidade de investigar como o tempo de incubação afetaria a atividade da enzima. Essa questão surgiu após 36 horas das amostras estarem prontas, motivando a realização deste estudo para esclarecer a influência do tempo de incubação na atividade da enzima, tanto em seu estado solúvel quanto imobilizado.

Observa-se que os valores de absorbância e de atividade enzimática não apresentam uma correspondência direta. Enquanto a absorbância reflete a quantidade de produto formado durante a reação, a atividade enzimática considera a taxa de conversão do substrato em produto por unidade de tempo. No caso da enzima imobilizada, fatores como limitações difusionais

podem retardar a interação entre a enzima e o substrato, afetando a eficiência catalítica. Assim, mesmo que a absorbância indique uma quantidade de produto semelhante ou superior, a atividade enzimática pode ser inferior devido a menor taxa de reação. Portanto, optou-se por utilizar um tempo de incubação de 20 minutos, buscando compensar as limitações difusionais e garantir uma conversão adequada do substrato.

5.1.1.4 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

Figura 16 - Efeito do aumento da concentração do substrato caseína de 0,1% a 1,3% m/v na hidrólise enzimática realizada pela enzima Alcalase®



Fonte: Elaborado pela autora

O ensaio foi conduzido com o objetivo de avaliar o comportamento da enzima frente à variação da concentração de substrato, especificamente na hidrólise da caseína. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos, demonstrando que o aumento da concentração do substrato, na faixa de 0,10% a 1,30% (m/v), resultou em um perfil de atividade enzimática característico de inibição por substrato.

Observa-se que a atividade enzimática atinge seu pico na concentração de 0,5% (m/v) de caseína. Acima desse valor, há uma diminuição na atividade, indicando a ocorrência de inibição enzimática. Concentrações superiores a 0,7% (m/v) devem ser evitadas, pois podem levar à subestimação da velocidade de reação e da formação de produtos. Por outro lado, concentrações inferiores a 0,3% (m/v) podem não explorar todo o potencial catalítico da enzima, resultando em menor produção de produto. Considerando o erro experimental e visando minimizar os efeitos de inibição, optou-se por utilizar a concentração de 0,3% (m/v) de substrato nos ensaios subsequentes.

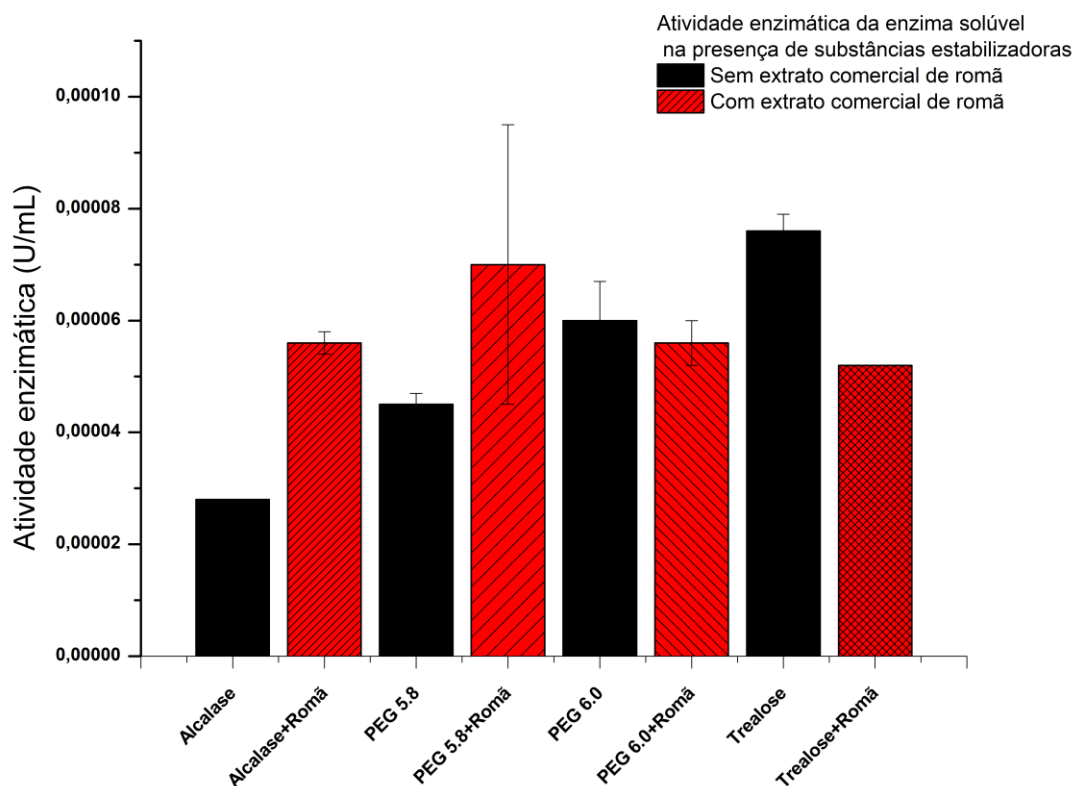
É importante ressaltar que o processo de inibição por substrato pode ocorrer durante a etapa de ligação do substrato ou na pré-organização conformacional da enzima, conforme descrito por Zhang *et al.* (2022). A caracterização detalhada do mecanismo de inibição por substrato requer a realização de ensaios específicos e a obtenção de dados físico-químicos, os quais não foram realizados neste estudo. Entretanto, os resultados obtidos indicam que a enzima em estudo sofre inibição em altas concentrações de substrato.

5.1.2 Substâncias para promover a estabilização da enzima frente ao extrato de romã

Agentes estabilizantes podem ser utilizados para promover a estabilidade da estrutura proteica da enzima, aumentar a estabilidade térmica e operacional, e evitar a agregação e desnaturação enzimática (Soares *et al.*, 2003).

O ensaio para promover a estabilidade da enzima por meio de substâncias estabilizadoras utilizou polietilenoglicol 5.800 e 6.000, devido à indisponibilidade de outras opções com diferentes pesos molecular, além do açúcar trealose. Os resultados podem ser visualizados nas Figura 17 e 18.

Figura 17 - Trealose e polietilenoglicol e sua influência na atividade enzimática da Alcalase® durante hidrólise da caseína 2,5% a 37 °C e pH 5,5. Trealose 5% m/v. Alcalase 0,3% v/v. Extrato comercial de romã a 1% (Romã). Polietilenoglicol 5.800 0,1% m/v (PEG 5.800). Polietilenoglicol 6.000 0,1% m/v (PEG 6.000). Coluna na cor preta representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo



Fonte: Elaborada pela autora

O açúcar trealose e os polietilenoglicóis (PEG) 5.800 e 6.000, em contato direto com a enzima solúvel, demonstraram aumento da atividade enzimática. A Alcalase® solúvel apresentou atividade de 0,000028 U/mL; com o PEG 5.800, a atividade foi de 0,000045 U/mL; com o PEG 6.000, de 0,000060 U/mL; e com a trealose, a atividade alcançou 0,000076 U/mL.

Entretanto, ao expor a enzima solúvel e as substâncias estabilizadoras ao extrato comercial de romã, observou-se uma diminuição da atividade enzimática em algumas delas: o PEG 6.000, com o extrato de romã e a enzima, apresentou atividade de 0,000056 U/mL, enquanto a trealose, na mesma condição, apresentou 0,000052 U/mL. O PEG 5.800, por sua vez, com o extrato de romã e a enzima, apresentou atividade de 0,000070 U/mL, sendo a única das substâncias estabilizadoras testadas que demonstrou proteção frente ao extrato vegetal, conforme apresentado na Figura 17.

Entre as substâncias avaliadas para promover a estabilização e aumento da atividade enzimática, a trealose apresentou o melhor desempenho. Esse açúcar pode proteger a enzima tanto em solução quanto em seu estado seco (Brom *et al.*, 2023).

O mecanismo de proteção pode ocorrer de três maneiras: reposição de água, retenção de água e vitrificação (BROM; PETRIKIS; PIELAK, 2023). Na reposição de água, o açúcar substitui as ligações de hidrogênio estabilizadoras fornecidas pela água à enzima em solução. No mecanismo de retenção de água, o açúcar aprisiona uma camada protetora de água na superfície da enzima seca. Já na vitrificação, forma-se uma matriz amorfa e vítrea de açúcar após a secagem da enzima imobilizada abaixo da temperatura de transição vítrea da matriz. Essa matriz limita a mobilidade da enzima, diminuindo as chances de desdobramento e degradação. (BROM *et al.*, 2023).

O polietilenoglicol, por sua vez, é um agente estabilizante macromolecular que, ao se ligar a enzima, pode evitar que alterações estruturais e agregações, promovendo um controle fino da estabilização por interações eletrostáticas (Soares *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2023). Devido à indisponibilidade de PEG com menor peso molecular, não foi possível aprofundar o estudo do seu efeito sobre a enzima Alcalase®.

A trealose e os PEGs 5.800 e 6.000, solubilizados e colocados em contato direto com a enzima solúvel por 30 minutos antes da imobilização, demonstraram potencial efeito protetor à Alcalase®, conforme ilustrado na Figura 17.

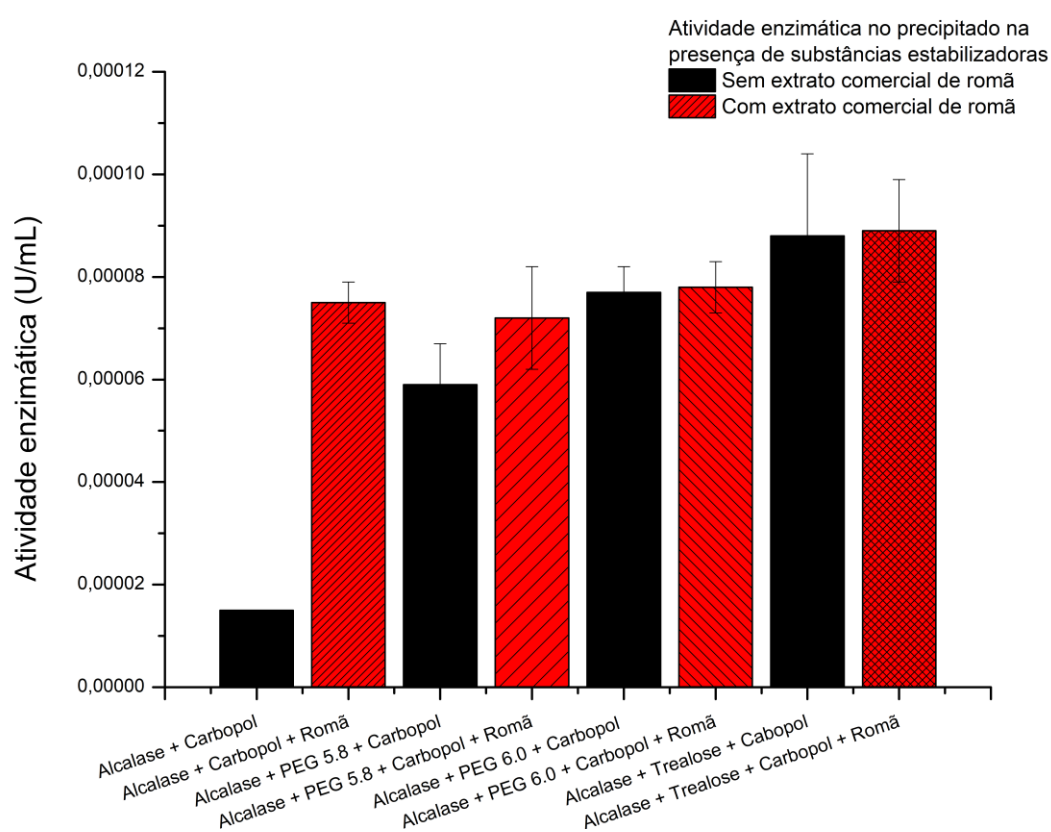
. Ao imobilizar a enzima no Carbopol 996, observou-se um aumento da sua atividade enzimática, indicando proteção conferida pelo polímero (Figura 18-a e Figura 18-b). Mesmo na presença do extrato comercial de romã, o Carbopol promoveu um pequeno aumento adicional na atividade enzimática da Alcalase®. A enzima imobilizada em Carbopol na presença de trealose apresentou maior atividade, como demonstrado nas Figuras 18-a e 18-b.

Na presença do extrato comercial de romã, os precipitados da imobilização enzimática contendo substâncias estabilizadoras apresentaram as seguintes atividades: 0,000072 U/mL com PEG 5.800 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%) + romã; 0,000078 U/mL com PEG 6.000 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%) + romã; e 0,000089 U/mL com trealose (5%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%) + romã. Na formulação sem estabilizadores, a atividade enzimática foi de 0,000075 U/mL (Alcalase® 0,3% + Carbopol 0,1% + romã).

Na ausência do extrato vegetal, as formulações com estabilizadores apresentaram: 0,000059 U/mL com PEG 5.800 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%); 0,000073 U/mL com PEG 6.000 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%); e 0,000099 U/mL com

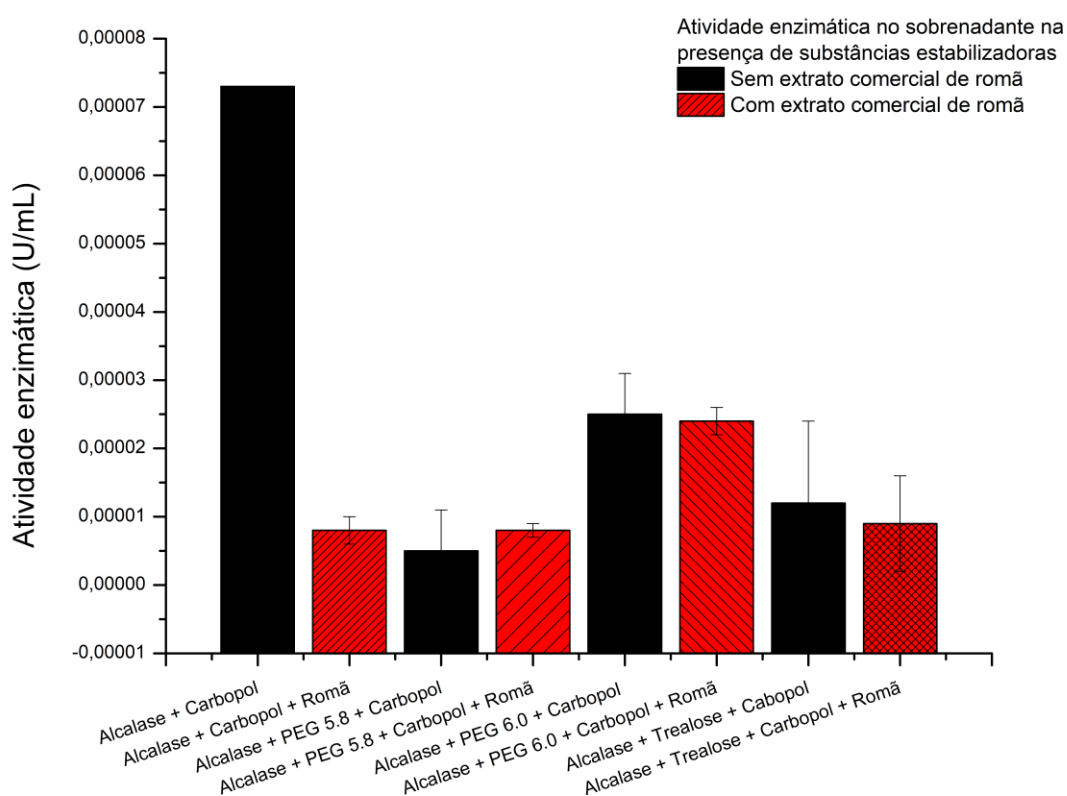
trealose (5%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%). A formulação controle, sem estabilizadores, apresentou atividade de 0,000015 U/mL (Alcalase® 0,3% + Carbopol 0,1%).

Figura 18 (a) - Trealose e polietilenoglicol e sua influência na estabilidade da atividade enzimática da Alcalase® imobilizada em carbopol 996, com incorporação do extrato comercial de romã durante hidrólise da caseína 2,5% m/v. Resultados obtidos no precipitado a 37 °C e pH 5,5. Trealose 5% m/v. Alcalase® 0,3% v/v. Extrato de romã comercial 1% v/v (Romã). PEG 5.800 e PEG 6.000 a 0,1% m/v. Coluna na cor preta representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 18 (b) - Trealose e polietilenoglicol e sua influência na estabilidade da atividade enzimática da Alcalase® imobilizada em Carbopol 996, com incorporação de extrato comercial de romã durante a hidrólise da caseína 2,5% m/v. Resultados obtidos no sobrenadante a 37 °C e pH 5,5. Trealose 5% m/v. Alcalase 0,3% v/v. Extrato de romã comercial 1% v/v. PEG 5.800 e PEG 6.000 a 0,1% m/v. Coluna na cor preta representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo



Fonte: Elaborada pela autora

Na presença do extrato comercial de romã, os sobrenadantes obtidos da imobilização enzimática contendo substâncias estabilizadoras apresentaram as seguintes atividades: 0,000008 U/mL com PEG 5.800 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%) + romã; 0,000023 U/mL com PEG 6.000 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%) + romã; e 0,000004 U/mL com trealose (5%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%) + romã. Na formulação sem estabilizadores, a atividade enzimática foi de 0,000008 U/mL (Alcalase® 0,3% + Carbopol 0,1% + romã).

Na ausência do extrato vegetal, as formulações com estabilizadores apresentaram: 0,000005 U/mL com PEG 5.800 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%); 0,000025 U/mL com PEG 6.000 (0,1%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%); e 0,000012 U/mL com

trealose (5%) + Alcalase® (0,3%) + Carbopol (0,1%). A formulação controle, sem estabilizadores, apresentou atividade de 0,000073 U/mL (Alcalase® 0,3% + Carbopol 0,1%).

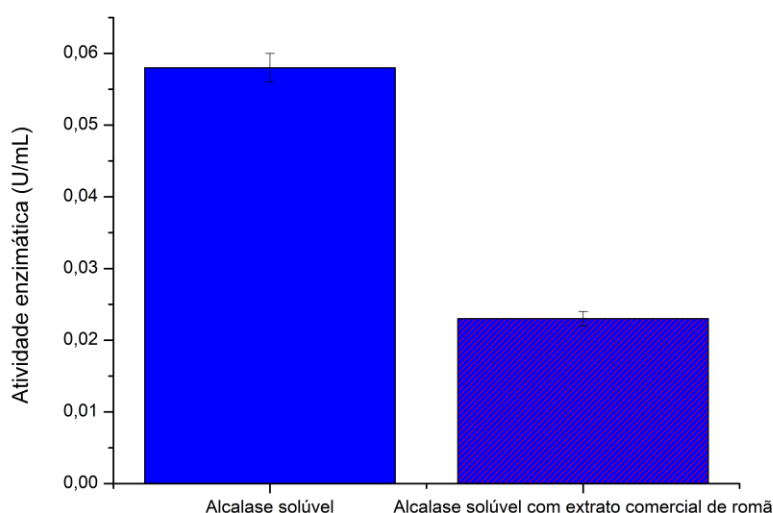
A Figura 18-a apresenta os resultados obtidos no precipitado das amostras, enquanto a Figura 18-b mostra os resultados obtidos no sobrenadante. A menor atividade enzimática observada no sobrenadante, em comparação ao precipitado, pode ser atribuída à efetiva imobilização da enzima, que permaneceu retida no precipitado.

5.1.3 Efeito do extrato de romã na atividade enzimática e preparação do gel base de Carbopol 996 0,6% para a imobilização da enzima Alcalase® e incorporação do extrato comercial de romã

5.1.3.1 Efeito do extrato de romã na enzima solúvel

No estudo da atividade enzimática da Alcalase® na forma solúvel, foi observado um nível de atividade enzimática de $0,058 \pm 0,002$ U/mL. No entanto, na presença do extrato comercial de romã, a atividade da enzima foi reduzida para $0,023 \pm 0,001$ U/mL, conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 19 – Atividade de hidrólise da caseína pela enzima Alcalase® solúvel, na presença e ausência do extrato de romã. Alcalase® 0,3% v/v e extrato de romã 1% v/v



Fonte: Elaborada pela autora

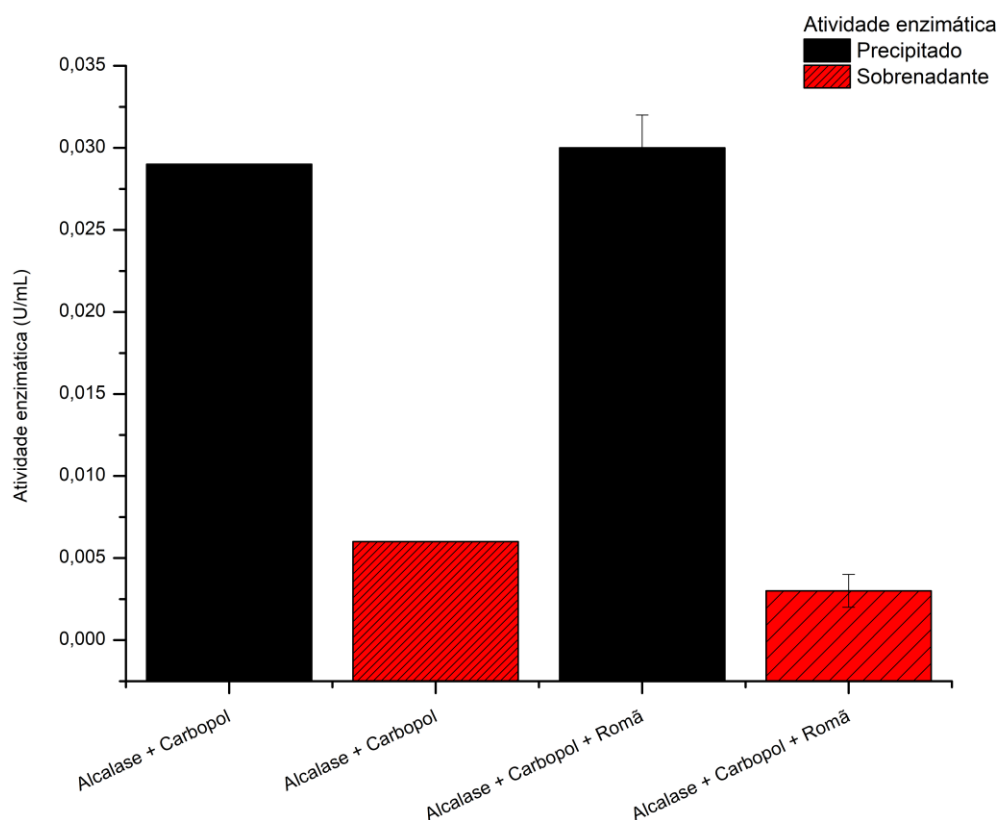
A Alcalase® apresentou uma redução de 61% em sua atividade na presença do extrato de romã, o que indica inibição provocada pelos metabólitos secundários presentes nesse extrato. Esse efeito inibitório já foi relatado na literatura por Colares et al. (2016), que, ao estudarem a classe das enzimas proteases, observaram que o extrato de romã contém compostos capazes de inibir o sítio ativo das enzimas quimotripsina e tripsina, estruturas comuns em proteases.

5.1.3.2 Efeito do extrato de romã na enzima imobilizada e com incorporação do extrato comercial de romã na imobilização

A Figura 20 apresenta os resultados de atividade enzimática obtidos a partir das amostras do sobrenadante e do precipitado da imobilização da enzima no Carbopol 996, com e sem a incorporação do extrato comercial de romã. A enzima Alcalase®, imobilizada em Carbopol 996, apresentou atividade enzimática média de $0,029 \pm 0,000$ U/mL no precipitado e de $0,006 \pm 0,000$ U/mL no sobrenadante.

A incorporação do extrato comercial de romã durante a imobilização enzimática, utilizando o Carbopol 996 como suporte, resultou em uma atividade enzimática de $0,030 \pm 0,002$ U/mL no precipitado e de $0,003 \pm 0,001$ U/mL no sobrenadante. Esses resultados indicam a retenção da enzima no precipitado, sugerindo a formação de ligações que contribuem para a proteção dos sítios ativos da enzima, como pode ser observado ao se comparar a atividade da enzima solúvel com a do precipitado.

Figura 20 – Atividade de hidrólise da caseína pela enzima Alcalase® imobilizada, com e sem a incorporação do extrato comercial de romã na imobilização. Alcalase® 0,3% v/v, Carbopol 0,1% m/v e extrato de romã 1% v/v. Coluna na cor preta representa a enzima solúvel na ausência do extrato comercial de romã e na cor vermelha na presença do mesmo



Fonte: Elaborada pela autora

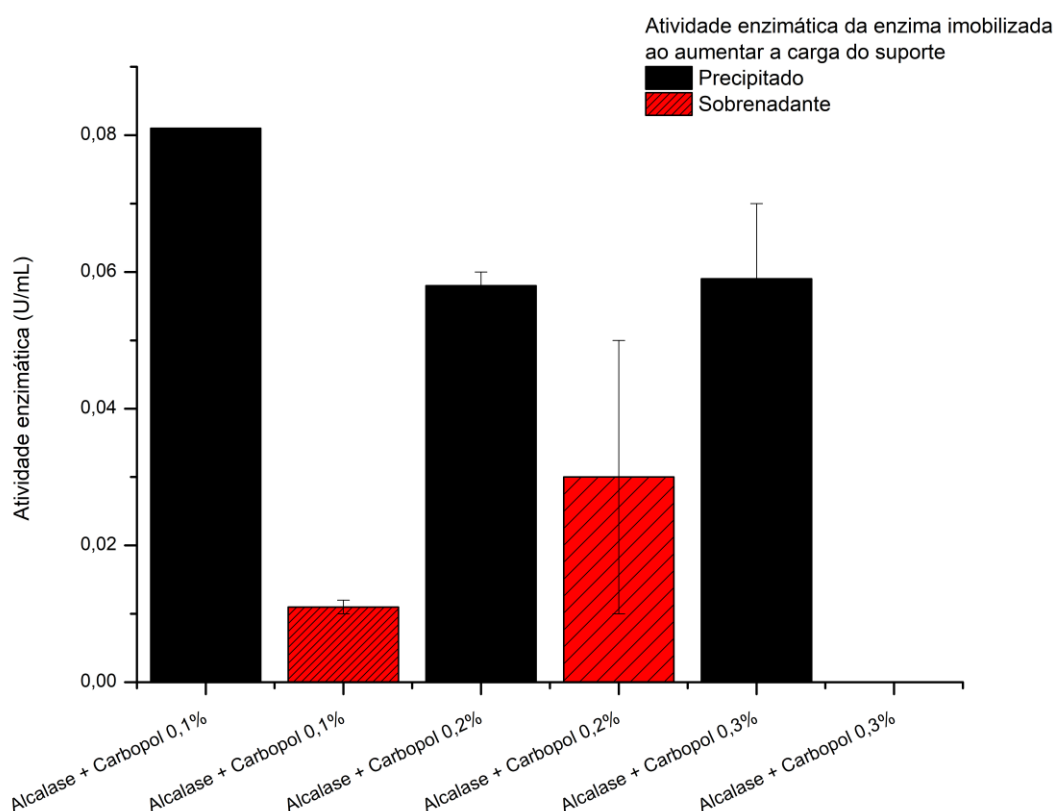
Duas hipóteses podem ser levantadas: a primeira é que a imobilização ocorreu por meio de ligações eletrostáticas, considerando que o Carbopol apresenta cargas negativas em sua superfície, enquanto a enzima Alcalase® possui cargas positivas (Weldrick et al., 2019; Abrantes, 2016). A segunda hipótese é que o extrato de romã não interagiu com a enzima no interior da partícula, já que os grupos fenólicos presentes em sua composição conferem cargas negativas, o que pode ter gerado repulsão em relação ao Carbopol (Paolini, 2023). Isso pode ter resultado na ausência de ligações tanto com o suporte quanto com a enzima, o que evidencia a complexidade das interações eletrostáticas e aponta para a necessidade de uma avaliação mais aprofundada do processo de imobilização.

É importante mencionar que o rendimento global de imobilização foi, em média, de 52% (retenção de atividade no precipitado). No sobrenadante, na ausência do extrato de romã, apenas 10% da enzima permaneceu ativa.

5.1.4 Influência da concentração do gel de Carbopol

O efeito da concentração do Carbopol na atividade da enzima pode ser observado na Figura 21, que apresenta os resultados obtidos para as três concentrações estudadas.

Figura 21 - Influência do aumento da concentração do suporte na atividade enzimática durante a hidrólise da caseína - Carbopol: 0,1% m/v; 0,2% m/v; 0,3% m/v. Enzima Alcalase®: 0,3% v/v. As colunas na cor preto mostram os valores no precipitado e em vermelho no sobrenadante



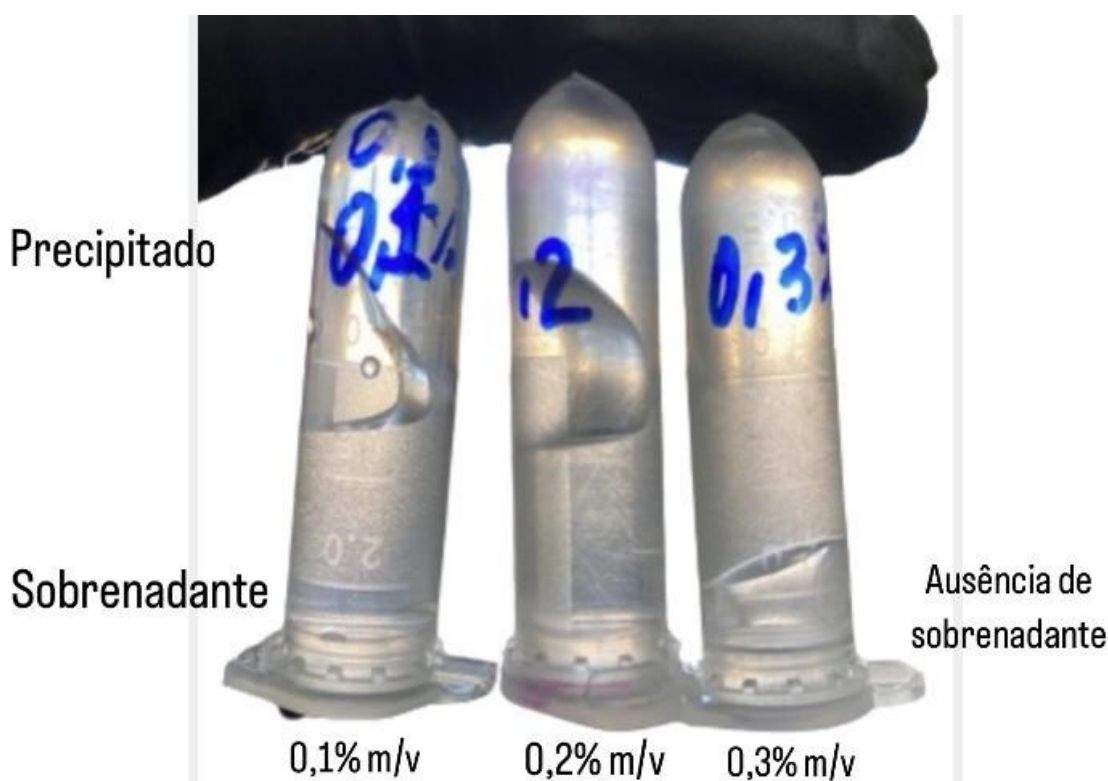
Fonte: Elaborada pela autora

Na concentração de 0,1% de Carbopol 996, a enzima permaneceu firmemente ligada ao suporte, apresentando atividade enzimática de $0,081 \pm 0,000$ U/mL no precipitado e $0,011 \pm 0,001$ U/mL no sobrenadante. Ao aumentar a concentração para 0,2%, mantendo-se a

quantidade de enzima constante, observou-se perda de enzima, com atividade enzimática no sobrenadante de $0,030 \pm 0,002$ U/mL e no precipitado de $0,058 \pm 0,002$ U/mL.

Na concentração de 0,3% de Carbopol, houve uma limitação experimental, pois a elevada viscosidade do gel impediu a separação eficiente entre o sobrenadante e o precipitado. A atividade enzimática obtida foi de $0,059 \pm 0,011$ U/mL. A rotação máxima da centrífuga utilizada não foi suficiente para realizar essa separação, conforme mostrado na Figura 22. Assim, o ensaio foi conduzido sem essa distinção, resultando em uma atividade semelhante às demais concentrações testadas.

Figura 22 - Carbopol 996 nas concentrações de 0,1% m/v, 0,2% m/v e 0,3% m/v



Fonte: Elaborada pela autora

Apesar da dificuldade observada na concentração de 0,3%, as diferentes concentrações de Carbopol utilizadas não demonstraram impactos substanciais na atividade enzimática. A decisão de trabalhar com a concentração de 0,1% foi tomada com base na melhor separação entre o precipitado e o sobrenadante, proporcionando condições ideais para os experimentos subsequentes com a incorporação do extrato comercial de romã.

A incorporação do extrato comercial de romã ao gel de Carbopol 996 fundamenta-se na capacidade do gel de expandir e contrair suas partículas conforme a variação do pH do meio. A

elevação e ajuste do pH para 5,5 com NaOH 0,25 M cria um ambiente ácido propício para a interação com a enzima Alcalase®.

Essa enzima apresenta um ponto isoelétrico elevado, próximo de 9, conferindo-lhe uma natureza catiônica em pH neutro. Isso facilita sua ligação ao Carbopol 996, que possui natureza aniônica.

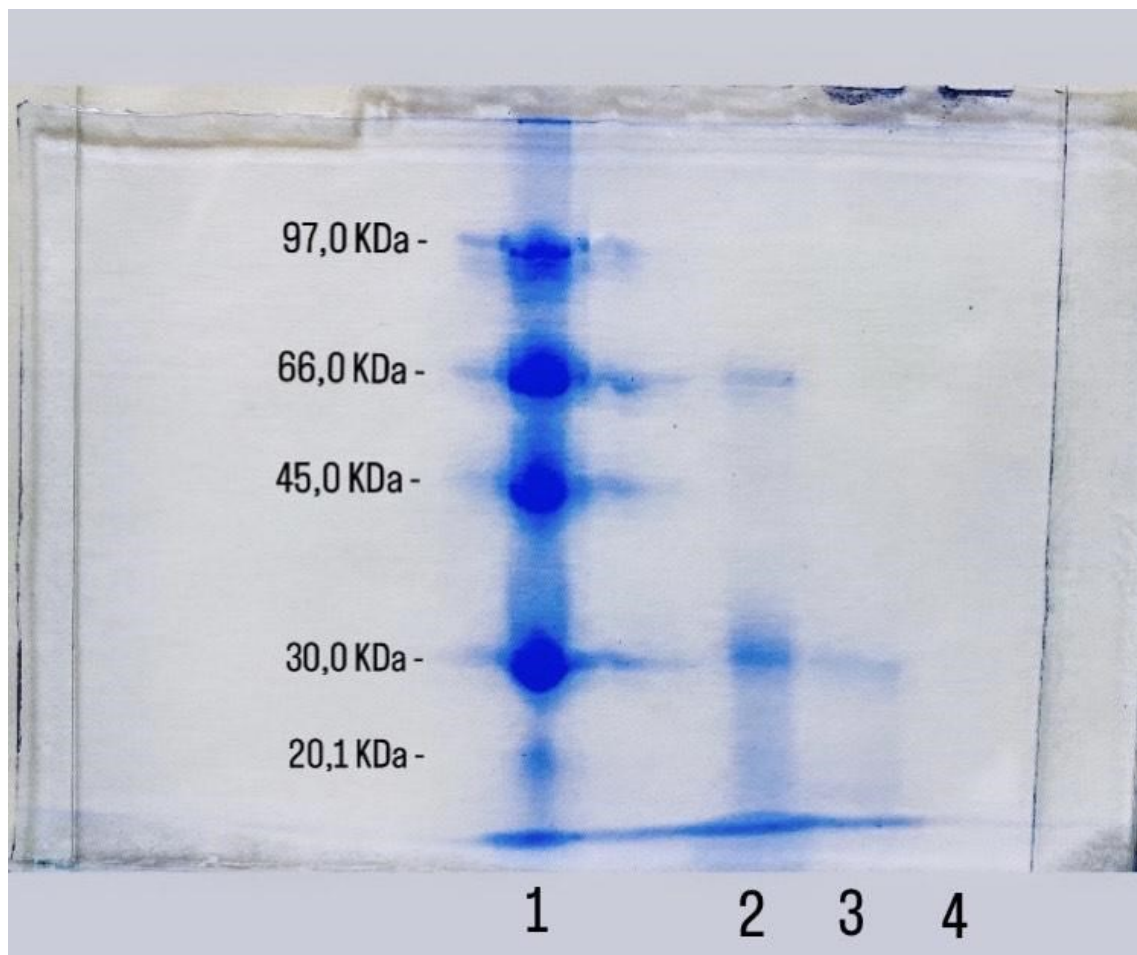
A escolha desse suporte foi baseada em sua estrutura química, que contém grupos carboxílicos, conferindo-lhe uma superfície aniônica. Essa característica possibilita a formação de ligações eletrostáticas com a enzima Alcalase®, consolidando sua eficácia no processo de imobilização. No entanto, a concentração do Carbopol pode impactar a imobilização ao gerar uma quantidade limitada ou excessiva de locais de ligação para a enzima (Weldrick et al., 2019).

A determinação da concentração ideal do suporte buscou otimizar a quantidade de sítios de ligação disponíveis, garantindo que a enzima se fixasse ao gel e evitando sua dispersão no meio, o que reduziria o risco de agregação. Esse equilíbrio também visou impedir o excesso de enzima livre e prevenir a reversão de cargas durante o processo de imobilização, evitando a transição de uma superfície externa negativa para positiva (Weldrick et al., 2019).

5.2 Eletroforese SDS-PAGE

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O padrão de bandas foi avaliado por coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250, conforme demonstrado na Figura 23.

Figura 23 - Eletroforese SDS-PAGE – 1: Marcador de baixo peso molecular; 2: Enzima solúvel 0,30 mg/mL; 3: Amostra (Alcalase® 0,114 mg/ml com a incorporação do extrato comercial de romã 1% v/v e imobilizada em Carbopol 0,1% m/v; 4: Carbopol 0,1% m/v



Fonte: Elaborada pela autora

Na Figura 23, o número 1 representa o marcador de baixo peso molecular utilizado como referência. No número 2, observa-se a amostra da enzima solúvel. De acordo com Amorim (2018), que utilizou o mesmo extrato comercial enzimático, essa amostra contém substâncias conservantes e estabilizadoras, sendo necessária a realização de diálise para eliminá-las. Foi observada uma possível banda proteica em 66 kDa. A enzima Alcalase® possui massa molecular de aproximadamente 27 kDa, estando presente tanto na amostra da enzima solúvel quanto na amostra 3 da enzima com a incorporação do extrato comercial de romã.

Segundo Tardioli et al. (2003), que realizaram eletroforese do extrato comercial da Alcalase® em diferentes diluições, também foi observada uma impureza com massa molecular de 66 kDa, indicando a necessidade de diálise em estudos futuros. No entanto, os autores não identificaram qual proteína estava presente nessa banda. Foi relatado ainda que a principal

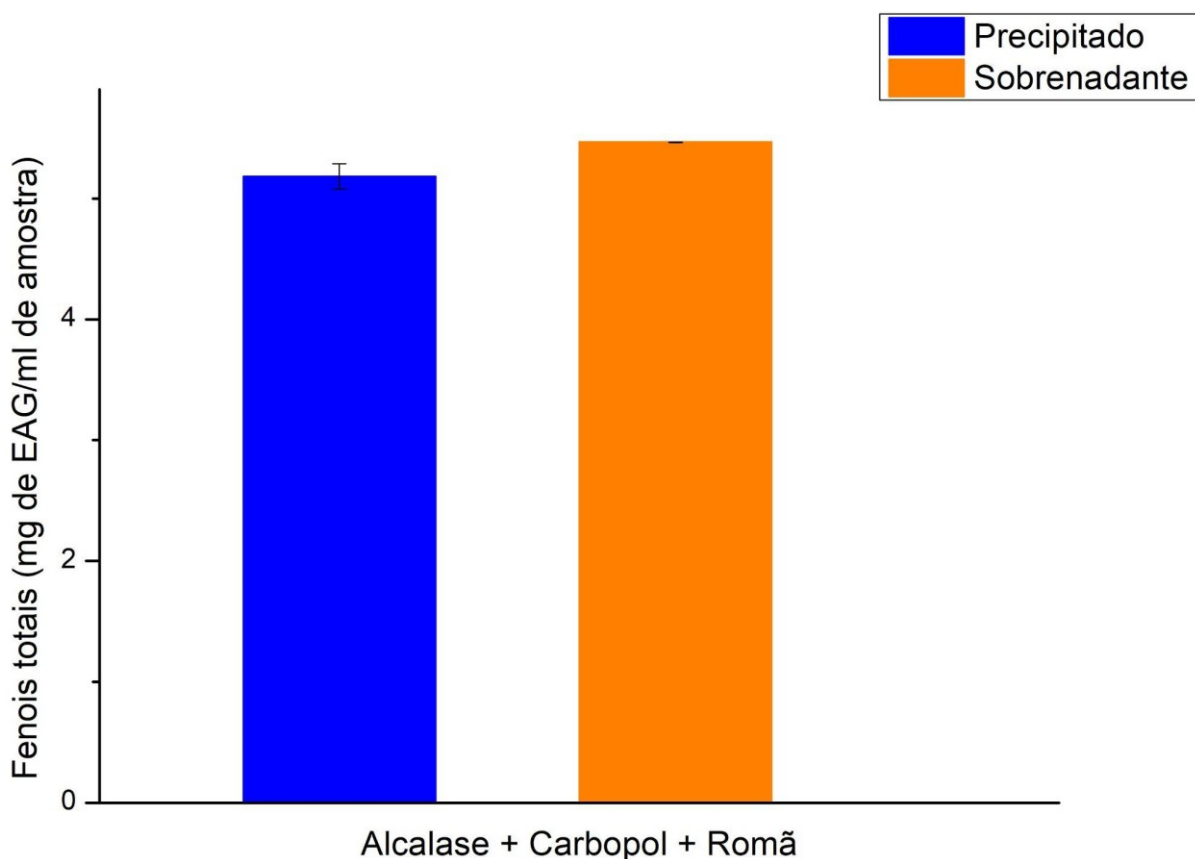
proteína presente no extrato comercial é a subtilisina, o que também foi evidenciado no presente estudo.

Na numeração 4 da Figura 23, encontra-se o controle com Carbopol na concentração de 0,1% m/v. A eletroforese revelou ausência de proteínas nessa amostra, confirmando que o Carbopol não apresenta proteína em sua estrutura.

5.3 Concentração de fenóis totais

O método de Folin-Ciocalteu foi empregado para a determinação dos fenóis totais nas amostras, conforme apresentado na Figura 24, sendo os resultados expressos em μg equivalentes de ácido gálico por mL de amostra. Todas as amostras exibiram a presença de compostos fenólicos.

Figura 24 - Concentração de fenóis totais, expressa em μg equivalentes de ácido gálico, utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Alcalase 0,3% v/v, extrato de romã comercial 1% v/v, Carbopol 0,1% m/v. EAG: equivalentes de ácido gálico



Fonte: Elaborada pela autora

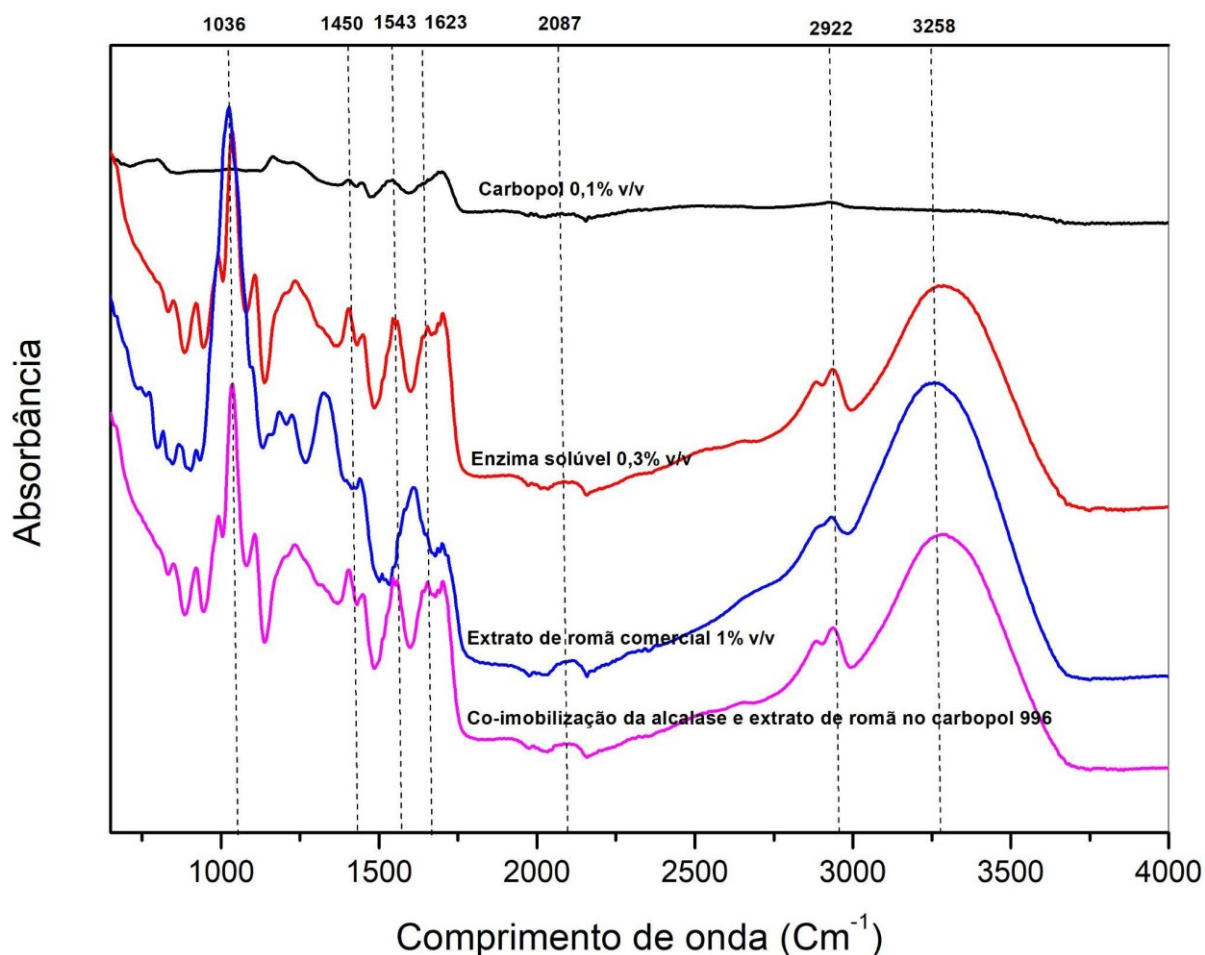
Devido à pequena quantidade utilizada — apenas 1% v/v de extrato de romã comercial na amostra de 50 mL de gel — foram obtidos valores de $5,18 \pm 0,104$ µg ácido gálico/mL no precipitado e $5,46 \pm 0,028$ µg ácido gálico/mL no sobrenadante. Esses resultados indicam que o Carbopol não retém os compostos fenólicos de forma efetiva em sua estrutura, permitindo que permaneçam solúveis no meio.

Os nossos achados corroboram o estudo realizado por Marsou et al. (2020), que ao analisarem a presença de fenóis no extrato utilizado, encontraram $272,82 \pm 3,05$ µg de equivalente de ácido gálico por miligrama de extrato utilizado.

5.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para investigar a composição da imobilização da enzima Alcalase® em Carbopol, com a incorporação do extrato comercial de romã. Na Figura 25, estão apresentados os espectros de FTIR das seguintes amostras: Carbopol a 0,1% m/v liofilizado; Alcalase® liofilizada a 0,3% v/v; extrato comercial de romã liofilizado a 1% v/v; e da imobilização em Carbopol 996 a 0,1% m/v com Alcalase® a 0,3% v/v e extrato comercial de romã a 1% v/v.

Figura 25 - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. **1** - FTIR do carbopol a 0,1% m/v liofilizado; **2** - FTIR Alcalase® liofilizada a 0,3% v/v; **3** - FTIR do extrato comercial de romã liofilizado a 1% v/v; **4** - FTIR da imobilização em carbopol 996 a 0,1% m/v com Alcalase a 0,3% v/v com a incorporação de extrato comercial de romã a 1% v/v



Fonte: Elaborada pela autora

O FTIR do Carbopol 996 liofilizado, Figura 25, apresenta um pico em 2922 cm^{-1} , indicando a presença de grupamentos de ácido carboxílico, conforme descrito por Lopes e Fascio (2004). Os autores Weldrick, Hardman e Paunov (2019) identificaram um pico forte em 3005 cm^{-1} , relacionado ao estiramento de ligações C–H alifáticas e à vibração de ligações carbonila (C=O), resultado semelhante ao observado neste estudo. Outro pico foi identificado em 1163 cm^{-1} , que, segundo os mesmos autores, está dentro da faixa de 1000 a 1195 cm^{-1} , indicando acoplamento entre a flexão do OH no plano e o alongamento do CO de grupos carboxílicos vizinhos.

O espectro de FTIR da enzima Alcalase® liofilizada apresentou um pico em 1543 cm^{-1} , próximo ao relatado por Agrawal et al. (2018), que indica a presença de estiramentos

assimétricos e simétricos de carbonilas, bem como grupamentos amida, característicos de proteínas. O pico em 1636 cm^{-1} indica uma amida terciária com estiramento forte, estando dentro da faixa de $1700\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$, conforme Lopes e Fascio (2004), que também relatam que picos em 3265 cm^{-1} indicam a presença de amidas primárias ou secundárias, com estiramento médio, na faixa de $3500\text{--}3070\text{ cm}^{-1}$.

Segundo Soltanzadeh et al. (2021), em seu estudo sobre o extrato de romã, foi identificada uma banda larga entre 3293 e 3450 cm^{-1} , atribuída à vibração de alongamento das bandas N–H e O–H, ou seja, a grupamentos amida presentes em compostos como ácido tânico, ácido elágico e ácido gálico. A amostra de extrato de romã liofilizado apresentou um pico em 3258 cm^{-1} , que, segundo Lopes e Fascio (2004), pode representar amidas primárias ou secundárias ou ainda a presença da própria enzima. Também foi identificado um pico em 2933 cm^{-1} , próximo ao valor de 2930 cm^{-1} relatado por Soltanzadeh et al. (2021), atribuído ao grupo C–H.

Outro pico observado na amostra, em 1700 cm^{-1} , aproxima-se do valor de 1732 cm^{-1} relatado pelos mesmos autores, referente ao grupamento C=O. Um pico em 1685 cm^{-1} também foi identificado, correspondendo ao encontrado por Soltanzadeh et al. (2021) em 1646 cm^{-1} , atribuído a uma carbonila. Os picos observados em 1439 , 1327 e 1226 cm^{-1} se assemelham aos relatados por esses autores em 1437 , 1350 e 1230 cm^{-1} , sendo atribuídos a vibrações do anel aromático.

O gel de Carbopol contendo Alcalase® com incorporação do extrato de romã apresentou picos associados aos componentes individuais. O pico em 649 e 1405 cm^{-1} é análogo ao do Carbopol isolado, assim como a banda em 1446 cm^{-1} , que foi deslocada para 1450 cm^{-1} , e a banda em 2080 cm^{-1} , deslocada para 2087 cm^{-1} . A Alcalase® apresentou picos característicos preservados em 850 , 991 , 1107 , 1543 , 2885 e 2937 cm^{-1} , exceto o pico em 1032 cm^{-1} , que foi deslocado para 1036 cm^{-1} . O extrato de romã também apresentou um pico análogo, deslocado de 1700 cm^{-1} para 1703 cm^{-1} .

Weldrick, Hardman e Paunov (2019), ao encapsularem a Alcalase® em seus estudos, observaram um pico em 1721 cm^{-1} , evidência de forte estiramento da ligação C=O, atribuído à ligação carbonila adjacente a uma amida secundária (péptida), resultado do efeito do encapsulamento na superfície do Carbopol. Neste estudo, foi observada a presença de um possível grupo amina primária ou secundária em 3280 cm^{-1} , estando dentro da faixa de $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, conforme descrito por Lopes e Fascio (2004).

5.5 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta permite identificar a carga elétrica das partículas presentes no meio, possibilitando avaliar a repulsão ou atração das cargas eletrostáticas, sendo um dos parâmetros utilizados para determinar a estabilidade do sistema. Foram preparadas três amostras para análise do potencial zeta e do tamanho do diâmetro médio das partículas, conforme apresentado na Tabela 4: Carbopol a 0,1% m/v; extrato comercial de romã a 1% v/v; e a imobilização da enzima Alcalase® 0,3% v/v em Carbopol a 0,1% m/v com a incorporação do extrato de romã a 1% v/v.

Tabela 4 - Potencial zeta e tamanho de partículas

Amostra	PE(mV)	Size(nm)
Carbopol a 0,1% m/v	-45,1 ± 1,10	3314±414,0
Extrato comercial de romã a 1% v/v	- 26,7 ± 4,15	3054 ± 710,9
imobilização da enzima Alcalase® 0,3% v/v em Carbopol a 0,1% m/v com a incorporação do extrato de romã a 1% v/v	-42,3 ± 1,44	3719 ± 1055

Fonte: Elaborada pela autora

O Carbopol, de maneira similar ao relatado na literatura pelos autores Weldrick *et al.*, (2019), apresenta em sua superfície carga aniônica, gerando um potencial zeta de -45,1 ± 1,10 mV, conforme demonstrado na Tabela 4. No estudo desses autores, foi encontrado o valor de -30 mV no mesmo pH utilizado neste trabalho. Essa carga negativa superficial é atribuída aos grupos carboxílicos levemente reticulados presentes na molécula do Carbopol, conforme descrito por Weldrick *et al.*, (2019).

A enzima Alcalase® já possui, conforme descrito no estudo dos mesmos autores, carga superficial positiva, ou seja, trata-se de uma proteína de caráter catiônico. Essa diferença de potencial possibilita a imobilização da enzima na superfície do Carbopol por meio de interações eletrostáticas.

Abrantes (2016), em seu estudo, identificou que o extrato de romã, devido à presença de substâncias fenólicas, possui caráter aniônico, corroborando os dados encontrados neste trabalho. O extrato comercial de romã apresentou potencial zeta de $-26,7 \pm 4,15$ mV (Tabela 4), em solução aquosa ultrapura com pH ajustado para 5,5 utilizando NaOH 0,25 M. Pode-se concluir que, por apresentar carga negativa, o extrato de romã sofre repulsão eletrostática dos grupos carboxílicos do Carbopol, permanecendo, assim, na superfície externa da matriz e não sendo imobilizado, diferentemente do que ocorre com a enzima, que, por possuir cargas positivas, se liga eletrostaticamente ao Carbopol.

A amostra contendo a imobilização realizada com o suporte Carbopol a 0,1% m/v utilizando a enzima Alcalase® a 0,3% v/v realizando a incorporação do extrato comercial de romã a 1% v/v, apresentou um potencial zeta de $-42,3 \pm 1,44$ mV, Tabela 4, , valor diferente da amostra contendo apenas Carbopol, o que indica que ocorreram interações eletrostáticas entre os três componentes.

Também foi avaliado o diâmetro médio das partículas. O gel de Carbopol a 0,1% m/v apresentou diâmetro médio de $3314 \pm 414,0$ nm, valor superior ao encontrado por Weldrick *et al.*, (2019), que relataram 102 nm para o Carbopol em pH 5,0. Esses autores também descreveram o diâmetro molecular da enzima Alcalase® em torno de 8 nm. Após o inchaço do Carbopol em pH 7,5 para a incorporação do antibiótico clindamicina (um composto catiônico que se liga eletrostaticamente à matriz do gel) e o subsequente desinchaço em pH 5,0, o novo diâmetro médio obtido foi de 140 nm. Quando a imobilização foi realizada com a Alcalase em pH 5,0, o diâmetro médio passou a ser de aproximadamente 149 nm.

No presente estudo, após o inchaço e desinchaço do Carbopol para a imobilização da Alcalase® e incorporação do extrato comercial de romã, foi obtido um diâmetro médio de 3719 ± 1055 nm, em pH 5,5. Esse aumento em relação ao valor inicial de $3314 \pm 414,0$ nm pode ser atribuído às interações eletrostáticas promovidas tanto pela Alcalase®, com seu potencial zeta positivo ($20 \pm 0,2$ mV, segundo Weldrick *et al.*, (2019), quanto pelo extrato de romã, que apresentou diâmetro médio de $3054 \pm 710,9$ nm e potencial zeta de $-26,7 \pm 4,15$ mV.

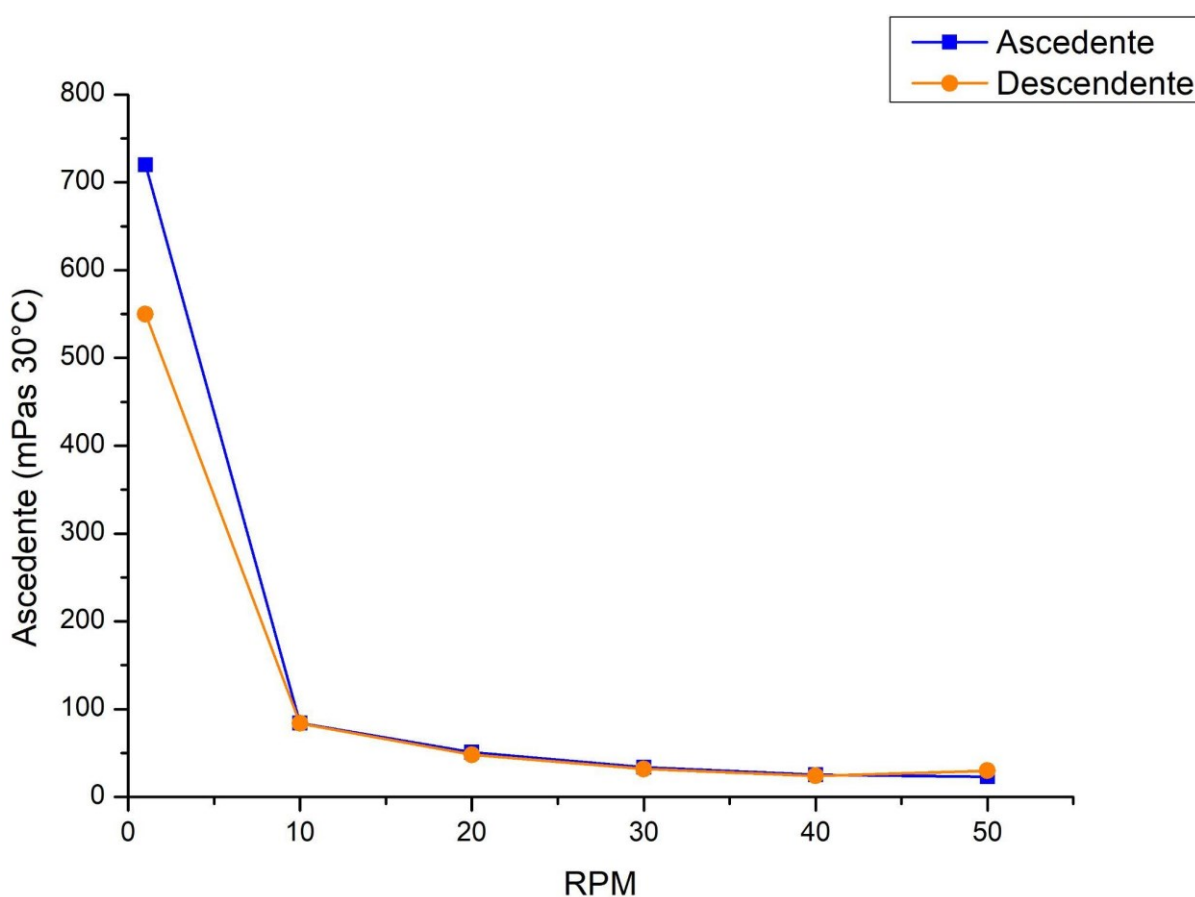
5.6 Análise reológica

Um fluido que apresenta variação na viscosidade com a alteração da velocidade de cisalhamento não obedece à Lei de Newton, sendo, portanto, classificado como fluido não newtoniano. Já fluidos simples, como a água ou um xarope, são caracterizados como newtonianos, enquanto sistemas dispersos, como emulsões, suspensões e géis, são classificados

como não newtonianos. Os fluidos não newtonianos vêm sendo cada vez mais utilizados em sistemas sofisticados de liberação de fármacos, especialmente aqueles à base de polímeros (Aulton, 2016).

O fluido newtoniano quando submetido a uma velocidade de cisalhamento crescente e que não varia com o tempo devido à viscosidade ser constante gera um gráfico linear. Quando um fluido foge dessa característica podemos visualizar a característica não newtoniana, como presente na Figura 26 (Aulton, 2016; Chorilli, 2007)

Figura 26 - Reograma do gel de Carbopol contendo enzima Alcalase® e extrato comercial de romã



Fonte: Elaborada pela autora

Os fluidos não newtonianos podem se classificar, como: plástico, pseudoplástico e dilatante (Aulton, 2016).

Ao realizar o estudo da viscosidade da formulação desenvolvida, observou-se que esta apresenta comportamento não newtoniano do tipo pseudoplástico, conforme ilustrado na Figura

26. É possível verificar no gráfico que a inclinação da curva diminui proporcionalmente com o aumento da velocidade de cisalhamento, não resultando em um gráfico linear, como seria o caso dos fluidos newtonianos (Aulton, 2016; Chorilli, 2007), e evidenciando a redução da viscosidade com o aumento da velocidade.

Segundo Aulton (2016) e Chorilli (2007), o Carbopol apresenta naturalmente comportamento de fluido pseudoplástico, o que também foi identificado neste estudo, mesmo após a adição da enzima e do extrato vegetal ao polímero.

Também foi realizado o estudo de tixotropia, com o objetivo de verificar se a viscosidade da formulação sofre alteração ao longo do tempo (Aulton, 2016, p. 219). Esse ensaio consiste em aumentar gradualmente a velocidade de cisalhamento e, em seguida, reduzi-la até zero, gerando uma curva ascendente e outra descendente, conforme apresentado na Figura 26.

De acordo com Aulton (2016), fluidos pseudoplásticos geralmente apresentam a curva descendente deslocada para a direita em relação à curva ascendente, enquanto os fluidos dilatantes apresentam a curva descendente à esquerda. No entanto, o gel analisado neste estudo apresentou comportamento dilatante, ou seja, contrário ao esperado para fluidos pseudoplásticos, divergindo do comportamento descrito por Aulton (2016) e Chorilli (2007).

Esse resultado inesperado pode ser atribuído à utilização de um spindle inadequado no equipamento durante o ensaio e/ou a um tempo insuficiente para a variação das velocidades de cisalhamento, o que pode não ter permitido que a formulação se reestruturasse, impedindo que as moléculas retornassem ao seu estado original (Aulton, 2016).

A característica dilatante indica que o material apresenta aumento de viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento, ou seja, o gel expande seu volume durante o processo de cisalhamento. Esse comportamento pode gerar impactos relevantes, especialmente durante o processamento industrial, como em misturadores ou moinhos de alta velocidade, podendo causar sobrecarga e até mesmo danos aos motores dos equipamentos. No contexto farmacêutico, pode afetar a distribuição do princípio ativo, gerando aglomerações e regiões desprovidas do fármaco, comprometendo a uniformidade da formulação (Aulton, 2016, p. 217).

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste estudo permitiu a análise da imobilização da enzima Alcalase® com a incorporação do extrato comercial de romã. A imobilização realizada mostrou-se eficaz, mantendo a atividade hidrolítica da enzima sobre a caseína, mesmo diante da presença de substâncias ativas no extrato de romã, conhecidas por sua capacidade inibitória sobre proteases.

Os resultados demonstraram que a trealose (0,000076 U/mL) e os polietilenoglicóis PEG 5.800 (0,000045 U/mL) e PEG 6.000 (0,000060 U/mL) aumentaram a atividade da Alcalase® solúvel em relação ao controle (0,000028 U/mL), sendo a trealose a mais eficaz. Na presença do extrato de romã, o PEG 5.800 manteve a maior atividade (0,000070 U/mL), demonstrando efeito protetor superior quando comparado ao PEG 6.000 (0,000056 U/mL) e à trealose (0,000052 U/mL).

Nas formulações imobilizadas com extrato vegetal, as maiores atividades foram observadas com trealose (0,000089 U/mL), seguida por PEG 6.000 (0,000078 U/mL), PEG 5.800 (0,000072 U/mL) e a formulação controle sem estabilizadores (0,000075 U/mL). Na ausência do extrato, os valores mais elevados foram novamente obtidos com trealose (0,000099 U/mL), seguida por PEG 6.000 (0,000073 U/mL), PEG 5.800 (0,000059 U/mL) e a formulação controle (0,000015 U/mL).

Os sobrenadantes apresentaram atividades enzimáticas muito inferiores, como 0,000004 U/mL (trealose), 0,000008 U/mL (PEG 5.800 e controle), e 0,000023 U/mL (PEG 6.000), reforçando a efetiva imobilização da enzima no precipitado.

Também possibilitou a realização da pesquisa com substâncias estabilizadoras da atividade enzimática para verificar se elas poderiam aumentar a atividade da enzima junto ao Carbopol 996, foi constatado que a utilização do açúcar trealose e polietilenoglicol trouxe um pequeno aumento da estabilidade da atividade da enzima quando comparado a utilização, somente, do Carbopol 996, mas que não justificava a sua incorporação na formulação.

Além disso, a pesquisa avaliou a ação de substâncias estabilizadoras da atividade enzimática, como o açúcar trealose e o polietilenoglicol (PEG), a fim de verificar possíveis ganhos de desempenho quando associados ao Carbopol 996. Embora tenha sido observado um leve aumento na estabilidade da atividade enzimática com o uso dessas substâncias, os resultados obtidos não justificam sua incorporação definitiva à formulação.

As análises por FTIR demonstraram que os grupamentos funcionais característicos da enzima, do extrato vegetal e do Carbopol 996 permaneceram preservados, mesmo após os

processos de imobilização e incorporação, indicando a manutenção de suas propriedades químicas. O ensaio de potencial zeta também indicou um aumento no diâmetro médio das partículas do Carbopol 996, sugerindo a ocorrência de imobilização da enzima e a incorporação do extrato de romã. Assim, permitindo que o objetivo principal do estudo proposto fosse atingido.

O estudo reológico identificou que o gel obtido apresenta comportamento de fluido não newtoniano do tipo pseudoplástico com tixotropia de natureza dilatante. Embora esse comportamento não fosse o esperado, é possível que o resultado tenha sido influenciado pela escolha inadequada do spindle e/ou pelo tempo insuficiente para a estabilização do sistema durante o ensaio.

Considerando a relevância do tema, a imobilização de enzimas com incorporação de extratos de plantas medicinais surge como uma estratégia promissora no desenvolvimento de formulações farmacêuticas voltadas à cicatrização de feridas. No entanto, torna-se imprescindível a realização de novos ensaios, tanto farmacotécnicos quanto clínicos, para validar a eficácia e a segurança dessa proposta terapêutica. Este possível tratamento alternativo poderá se tornar mais uma estratégia de enfrentamento à resistência bacteriana.

Dessa forma, conclui-se que o uso da imobilização enzimática associado a extratos vegetais permite explorar, de maneira eficiente, o potencial biotecnológico de enzimas e compostos naturais. Contudo, a consolidação dessa abordagem ainda depende de estudos complementares que assegurem sua viabilidade para aplicação clínica e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

© 2023 MERCK KGAA (Alemanha). **126741 Sigma-Aldrich**: enzima alcalase, *bacillus licheniformis*®. Enzima ALCALASE, Bacillus licheniformis®. 2023. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/ALCALASE-Enzyme-Bacillus-licheniformis,EMD_BIO-126741#anchor_orderingcomp. Acesso em: 11 nov. 2023.

ABRANTES, Antônio César Nobre de. **Obtenção de sistemas microemulsionados, a partir de óleos vegetais, para incorporar o extrato seco de *Punica granatum***. 2016. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/21563/1/AntonioCesarNobreDeAbrantes_DISERT.pdf. Acesso em: 24 dez. 2023.

AGRAWAL, Sarika; SHARMA, Isha; PRAJAPATI, Bhanu Pratap; SURYAWANSHI, Rahul Kumar; KANGO, Naveen. Catalytic characteristics and application of l-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.I.], v. 114, p. 504-511, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.081>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301830494X?casa_token=ER9xP-4_6mQAAAAA:oOE6l3JZSrPWI19fh1V_xqiBEXxvVOjqOno4OhXEbGHWA4Er9lC1DRXCXkdTafuQO_Zz6oVs_39. Acesso em: 9 dez. 2023.

ALAM, Prawez; SHAKEEL, Faiyaz; FOUDAH, Ahmed I.; ALSHEHRI, Sultan; SALFI, Roshan; ALQARNI, Mohammed H.; ALJARBA, Tariq M.. Central Composite Design (CCD) for the Optimisation of Ethosomal Gel Formulation of Punica granatum Extract: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Gels**, [S.I.], v. 8, n. 8, p. 511, 17 ago. 2022. MDPI AG. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/gels8080511>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2310-2861/8/8/511>. Acesso em: 21 nov. 2023.

AMORIM, Kimberle Paiva dos Santos. **IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE ALCALASE® EM IMMOBEAD 350 E EM QUITOSANA ATIVADA POR DIFERENTES MÉTODOS VISANDO APLICAÇÃO EM REAÇÃO MODELO**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/32334>. Acesso em: 1 dez. 2023.

AULTON, Michel F.; TAYLOR, Kevin. M. G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda., 2016. 872 p.

BOUDRANT, Joseph; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 90, p. 66-80, mar. 2020. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511319316861?via%3Dihub>. Acesso em: 03 fev. 2024.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. . **Formulário de**

Fitoterápicos: farmacopeia brasileira. 2. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. 223 p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/2023-fffb2-1-er-2-atual-final-versao-com-capa-em-word-25-abr-2023.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2023.

BRASIL. KARLA DO NASCIMENTO MAGALHÃES. . **Plantas medicinais da caatinga do nordeste brasileiro:** etnofarmacopeia do professor francisco josé de abreu matos. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2020. 253 p. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/54867/1/2020_liv_knmagalhaes.pdf. Acesso em: 5 nov. 2023.

BROM, Julia A.; PETRIKIS, Ruta G.; PIELAK, Gary J.. How Sugars Protect Dry Protein Structure. **Biochemistry**, [S.L.], v. 62, n. 5, p. 1044-1052, 18 fev. 2023. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00692>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/action/doSearch?field1=Contrib&text1=%22Julia+A.+Brom%22&field2=AllField&text2=&publication=&accessType=allContent&Earliest=&ref=pdf>. Acesso em: 28 jan. 2024.

CÂMARA, Marcos Vinicius Santos da; FELIX, Caroline Almeida; CORGOZINHO, Marcelo Moreira. Enfermagem no contexto da infecção da ferida cirúrgica: revisão integrativa. **Health Residencies Journal - Hrrj**, [S.L.], v. 3, n. 14, p. 941-960, 4 jan. 2022. Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde. <http://dx.doi.org/10.51723/hrj.v3i14.352>. Disponível em: <https://escsresidencias.emnuvens.com.br/hrj/article/view/352>. Acesso em: 24 dez. 2023. CASTRO, Heizir F. de. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 832-838, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000600010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/ypB9QrCyhGVLVK8NDhHTHVc/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 28 jan. 2024.

CHEUNG, L.M.; CHEUNG, Peter C.K.; OOI, Vincent E.C.. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 81, n. 2, p. 249-255, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00419-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00419-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814602004193?via%3Dihub>. Acesso em: 17 set. 2023.

CHORILLI, Marlus Chorilli. INFLUÊNCIA DA VISCOSIDADE DO VEÍCULO NA LIBERAÇÃO IN VITRO DA CAFEÍNA. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 52-60, 24 out. 2007. Universidade Federal de Goiás. <http://dx.doi.org/10.5216/ref.v4i1.2121>. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/2121/2068>. Acesso em: 26 dez. 2023.

COLARES, Lara Franca; SANTOS NETO, Antero Ricardo; CORDEIRO, Isac Henrique; CASTRO, Sandra Bertelli Ribeiro; VERLY, Rodrigo; ALVES, Caio de Souza; CARLI, Alessandra de Paula. Detecção de inibidores de proteases em sementes de *Punica granatum*. **Química Nova**, [S.L.], v. 3, n. 40, p. 270-274, 21 nov. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160189>. Disponível em: <https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.s bq.org.br/quimicanova.s bq.org.br/pdf/AR20160366.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2023.

COSTA, Cleuson Vieira; GOMES, Edilene Bispo; FONSECA, Hadsan Taiana Aleixo da; QUARESMA, Odileia Borges; BAENA JÚNIOR, Odemar Raimundo Goncalves; COSTA, Silvio Douglas Medeiros; LOUREIRO, Suellen Patrícia Sales da Costa; SILVA, Suenildo Messias da. Assistência de enfermagem no cuidado de feridas na atenção primária em saúde: revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S.L.], v. 0, n. 48, p. 3303-3314, 12 jun. 2020. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. <http://dx.doi.org/10.25248/reas.e3303.2020>. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/3303/1997>. Acesso em: 17 nov. 2023.

DENTI, Andressa Franco. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, [S.L.], v. 45, n. 171, p. 97-110, 13 out. 2021. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. <http://dx.doi.org/10.31512/persp.v.45.n.171.2021.168.p.97-110>. Disponível em: <http://ojs.uricer.edu.br/ojs/index.php/perspectiva/article/view/168>. Acesso em: 25 nov. 2023.

DONG, Qin; MATTES, Timothy E.; LEFEVRE, Gregory H.. Development of a Novel PCB-Degrading Biofilm Enriched Biochar Encapsulated with Sol–Gel: a protective layer to sustain biodegradation activity. **Acs Es&T Engineering**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 883-898, 6 mar. 2025. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsestengg.4c00718>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsestengg.4c00718>. Acesso em: 13 abr. 2025.

DUARTE, Cláudia Margarida Gouveia. **Caracterização Químico-Física de Novos Polímeros Estabilizantes para Formulações da Indústria de Cosméticos**. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011. Disponível em: https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/17545/1/TESE_FINAL_Claudia_Duarte.pdf. Acesso em: 10 nov. 2023.

GALO, André Luiz; COLOMBO, Márcio Francisco. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000200036>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/ZY45c79NHd9vMzfgJWVXZHR/>. Acesso em: 25 jan. 2024.

GARCIA-GALAN, Cristina; SANTOS, José C.s. dos; BARBOSA, Oveimar; TORRES, Rodrigo; PEREIRA, Ernandes B.; CORBERAN, Vicente Cortes; GONÇALVES, Luciana R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 604-616, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.028>.

GILLESPIE, Brigid M.; WALKER, Rachel M.; MCINNES, Elizabeth; MOORE, Zena; ESKES, Anne M.; O'CONNOR, Tom; HARBECK, Emma; WHITE, Codi; SCOTT, Ian A.; VERMEULEN, Hester. Preoperative and postoperative recommendations to surgical wound care interventions: a systematic meta-review of cochrane reviews. **International Journal Of Nursing Studies**, [S.L.], v. 102, p. 103486, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2019.103486>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020748919302937?via%3Dihub>. Acesso

em: 24 dez. 2023.

GIONGO, Janice Luehring. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/14798>. Acesso em: 06 dez. 2023.

GIONGO, Janice Luehring. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por GRATIERI, Taís; GELFUSO, Guilherme Martins; LOPEZ, Renata Fonseca Vianna.** Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000600040>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/3FVBPDXRSWx8KCg4DntKmYm/>. Acesso em: 22 nov. 2023.

HUSSAIN, Fouzia; ARANA-PEÑA, Sara; MORELLON-STERLING, Roberto; BARBOSA, Oveimar; BRAHAM, Sabrina Ait; KAMAL, Shagufta; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Further Stabilization of Alcalase Immobilized on Glyoxyl Supports: amination plus modification with glutaraldehyde. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 12, p. 3188, 3 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23123188>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320783/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

ILLANES, Andrés. **Enzyme Biocatalysis:: principles and applications.** Chile: Springer, 2008. 398 p.

INTELLIGENCE, Mordor. **Industrial Enzymes Market Size & Share Analysis - Growth Trends & Forecasts (2023 - 2028) Source:** <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market>. 2023. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/industrial-enzymes-market>. Acesso em: 16 nov. 2023.

ISSA, Maria Cláudia Almeida; MANELA-AZULAY, Mônica. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 85, n. 4, p. 501-511, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962010000400011>.

Jacob J, Lakshmanapermalsamy P, Illuri R, Bhosle D, Sangli GK, Mundkinajeddu D. *In vitro* Evaluation of Antioxidant Potential of Isolated Compounds and Various Extracts of Peel of *Punica granatum* L. **Pharmacognosy Res.** 2018 Jan-Mar;10(1):44-48. doi: 10.4103/pr.pr_36_17. PMID: 29568186; PMCID: PMC5855372. Acesso em: 01 dez. 2023

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia: básica & clínica.** 10.ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. xiii, 1046 p. ISBN 9788563308054 (broch.).

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [S.L.], v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0>. Acesso em: 28 nov. 2023.

LEITE, Laysa Rúbia Veras. **FARMACOLOGIA DAS FERIDAS: UMA REVISÃO DE LITERATURA.** 2018. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de

Campina Grande, Cuité, 2018. Disponível em:

<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/riufcg/6788/LAYSA%20R%20BIA%20VERAS%20LEITE%20%20TCC%20BACHARELADO%20EM%20FARM%20CIA%20CES%202018.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 21 nov. 2023.

LEITE, Laysa Rúbia Veras; ARAÚJO, Igor César Roque de; OLIVEIRA, Fernando de Sousa. ASPECTOS FARMACÊUTICOS DA FARMACOTERAPIA DE FERIDAS: uma revisão de literatura. **Educação, Ciência e Saúde**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 281-300, 28 jun. 2020. Biblioteca do Centro de Educacao e Saúde (CES). <http://dx.doi.org/10.20438/ecs.v7i1.262>. Disponível em:

https://scholar.archive.org/work/z47retp7k5fpjkzx62alutkcfi/access/wayback/http://periodicos.ces.ufcg.edu.br/periodicos/index.php/99cienciaeducacaosaude25/article/download/262/pdf_89. Acesso em: 24 dez. 2023.

LI, Aotian; WANG, Xinyue; DAFOE, Julian T.; YANG, Trent C.; LAN, Christopher Q.. Development of Alcalase-Polyacrylonitrile Nanofibrous Biocatalytic Membranes for Protein Hydrolysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [S.L.], v. 63, n. 39, p. 16662-16671, 21 set. 2024. American Chemical Society (ACS).

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.iecr.4c01398>. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.4c01398>. Acesso em: 15 abr. 2025.

LOPES, Wilson Araújo; FASCIO, Miguel. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 670-673, ago. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000400025>. Disponível em: 9. Acesso em: 04 dez. 2023.

MARSOUL, A.; IJJAALI, M.; ELHAJJAJI, F.; TALEB, M.; SALIM, R.; BOUKIR, A.. Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid methanolic extract of pomegranate bark (*Punica granatum* L): evaluation of the inhibitory effect in acidic medium 1 ::m hall. **Materials Today: Proceedings**, [S.L.], v. 27, p. 3193-3198, 2020. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2020.04.202>. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785320328170?casa_token=JH-VUeC8OdUAAAAA:lnc3yip2nSj-HIUR53kzgl2F9oUy9XPixaAUzddVuA0akJTvQB2T0C9MaC5bqvXf9Rcv3a_IHF1. Acesso em: 02 dez. 2023.

MEDEIROS, Aldo Cunha; DANTAS-FILHO, Antônio Medeiros. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *Journal Of Surgical And Clinical Research*, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 87, 2 mar. 2017. *Journal of Surgical and Clinical Research*. <http://dx.doi.org/10.20398/jscr.v7i2.11438>.

MIRANDA, Liceris Corrêa de. **Obtenção e caracterização de hidrolisados enzimáticos e proteínas do farelo de soja**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012. Disponível em:

<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/4100/4557.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 25 dez. 2023.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250 p.

PANDE, Monu; DUBEY, Vikash K.; YADAV, Subhash C.; JAGANNADHAM, Medicherla V.. A Novel Serine Protease Cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: • purification and biochemical characterization. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 54, n. 26, p. 10141-10150, 1 dez. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf062206a>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf062206a>. Acesso em: 15 abr. 2025.

PAOLINI, Nicolas Augusto. **DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E EXTRATO DE ROMÃ E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO EM FILMES POLIMÉRICOS**. 2023. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2023. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/32037/1/microparticulasquitosanaantimicrobi-anofilmes.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2024.

PESSATO, Tássia Batista. **HIDROLISADOS DE ISOLADO PROTEICO DO SORO DE LEITE OBTIDOS COM ALCALASE LIVRE E IMOBILIZADA::** hidrolisados de isolado proteico do soro de leite obtidos com alcalase livre e imobilizada: caracterização e detecção de proteínas alergênicas. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de 'Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/Busca/Download?codigoArquivo=460854>. Acesso em: 25 dez. 2023.

POLGÁR, L.. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 62, n. 19-20, p. 2161-2172, 7 jul. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5160-x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16003488/>. Acesso em: 07 mar. 2024.

RAMALHO, Márcia Pinheiro; SANTOS, Sandna Larissa; DE CASTRO, Nadinny Meneses; VASCONCELOS, Leina Mércia de Oliveira; MORAIS, Isabel Cristina de Oliveira; PESSOA, Cínara Vidal. PLANTAS MEDICINAIS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Expressão Católica Saúde**, Quixadá, v. 2, n. 3, p. 1-7, 17 dez. 2018. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/40915/1/2018_art_mpramvalho.pdf. Acesso em: 18 nov. 2023.

REDDY, Narendra; DEEKONDA, Vidyavathi; SESHAGIRI, Swetha; REDDY, Roopa; GANGULA, Ambika Kanakayya. Production, characterization and applications of proteases produced by *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter pittii* and *Aspergillus niger* using neem seed oil cake as the substrate. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 187, p. 115403, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115403>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666902200886X?casa_token=ICAXtTs_bS0AAAAA:Lor9_5Ry3RY3YURksX43-LS2B6DwBWc47csbzkXHA_MUKP2N6LlKiMOpwUEcSxYBALZXmg8-nfi. Acesso em: 01 dez. 2023.

REIS, Carla Luzia Borges. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS BASEADOS EM MONOETANOLAMINA E COLINA E APLICAÇÃO NA CRISTALIZAÇÃO DO FÁRMACO ISONIAZIDA**. 2021. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química,

Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/64329/1/2021_tese_CLBReis.pdf. Acesso em: 4 dez. 2023.

RUMON, Md. Mahamudul Hasan; AKIB, Anwarul Azim; SARKAR, Stephen Don; KHAN, Md. Abu Rayhan; UDDIN, Md. Mosfeq; NASRIN, Dina; ROY, Chanchal Kumar. Polysaccharide-Based Hydrogels for Advanced Biomedical Engineering Applications. **Acs Polymers Au**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 463-486, 20 ago. 2024. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acspolymersau.4c00028>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acspolymersau.4c00028>. Acesso em: 12 abr. 2025.

SANTOS, Leidiane A.; SIQUEIRA, José G. M.; FARIA, Elaine A. Faria A.; MARTINS, Marccus V. A.; OLIVEIRA, Jocélia P. C. Direct Synthesis of Gold Nanoparticles Conjugated with the Enzyme Trypsin: structural and morphological aspects. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 439-445, 2023. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220106>. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/4466/1046>. Acesso em: 28 jan. 2024.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, [S.L.], v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 27 mar. 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60075k>.

SOARES, Cleide Mara Faria; SANTANA, Maria Helena Andrade; ZANIN, Gisella M.; CASTRO, Heizer F. de. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 832-838, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000600010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/ypB9QrCyhGVLVK8NDhHHTVc/>. Acesso em: 23 jan. 2024.

SOLTANZADEH, Maral; PEIGHAMBARDoust, Seyed Hadi; GHANBARZADEH, Babak; MOHAMMADI, Maryam; LORENZO, José M.. Chitosan Nanoparticles as a Promising Nanomaterial for Encapsulation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extract as a Natural Source of Antioxidants. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1439, 29 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano11061439>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/6/1439>. Acesso em: 10 dez. 2023.

SOUSA, Cleyton Marcos de M.; SILVA, Hilris Rocha e; VIEIRA-JR., Gerardo Magela; AYRES, Mariane Cruz C.; COSTA, Charllyton Luis S. da; ARAÚJO, Delton Sérvulo; CAVALCANTE, Luis Carlos D.; BARROS, Elcio Daniel S.; ARAÚJO, Paulo Breitner de M.; BRANDÃO, Marcela S.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 351-355, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200021>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/4d6yvCyDmhHyfP9ZJqV6nDy/>. Acesso em: 21 set. 2023.

SOUSA, Márcia Beatriz Viana de; BEZERRA, Alexsandra Maria Ferreira de Araújo; COSTA, Cleuson Vieira; GOMES, Edilene Bispo; FONSECA, Hadsan Taiana Aleixo da; QUARESMA, Odileia Borges; BAENA JÚNIOR, Odemar Raimundo Gonçalves; COSTA, Silvio Douglas Medeiros; LOUREIRO, Suellen Patrícia Sales da Costa; SILVA, Suenildo Messias da. Assistência de enfermagem no cuidado de feridas na atenção primária em saúde: revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S.L.], n. 48, p. 3303-3314, 12 jun.

2020. Revista Eletronica Acervo Saude. <http://dx.doi.org/10.25248/reas.e3303.2020>. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/3303>. Acesso em: 10 dez. 2023.

SOUSA, Nágila Caroline Fialho; GONZAGA, Laoane Freitas; RODRIGUES, João Francisco Silva; FERNANDES, Elizabeth Soares. Propriedades farmacológicas de Punica granatum L (romã): uma revisão de literatura. **Revista Ceuma Perspectivas**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 57-67, 31 jul. 2018. Ceuma Associação de Ensino Superior. <http://dx.doi.org/10.24863/rccp.v31i1.181>. Disponível em: <http://www.ceuma.br/portalderevistas/index.php/RCCP/article/view/181>. Acesso em: 5 nov. 2023.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G.; MORELLON-STERLING, Roberto; SIAR, El-Hocine; TAVANO, Olga; BERENGUER-MURCIA, Ángel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 165, p. 2143-2196, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813020346912?via%3Dihub>. Acesso em: 07 mar. 2024.

TARDIOLI, Paulo W.; PEDROCHE, Justo; GIORDANO, Raquel L. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José M.. Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. **Biotechnology Progress**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 352-360, jan. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp025588n>. Disponível em: <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp025588n>. Acesso em: 03 mar. 2024.

THÁLYTA FRAGA PACHECO (Brasília). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Guia prático para caracterização de enzimas**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2021. 61 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1131161/guia-pratico-para-caracterizacao-de-enzimas>. Acesso em: 25 jan. 2024.

VERA, Myleidi; MELLA, Claudio; URBANO, Bruno F.. SMART POLYMER NANOCOMPOSITES: recent advances and perspectives. **Journal Of The Chilean Chemical Society**, [S.L.], v. 65, n. 4, p. 4973-4981, dez. 2020. SciELO Agencia Nacional de Investigacion y Desarrollo (ANID). <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072020000404973>. Disponível em: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-97072020000404973&script=sci_arttext. Acesso em: 23 fev. 2024.

WELDRICK, Paul J.; HARDMAN, Matthew J.; PAUNOV, Vesselin N.. Enhanced Clearing of Wound-Related Pathogenic Bacterial Biofilms Using Protease-Functionalized Antibiotic Nanocarriers. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [S.L.], v. 11, n. 47, p. 43902-43919, 13 nov. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsami.9b16119>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.9b16119>. Acesso em: 05 dez. 2023.

YU, Miao; ZHAO, Wu; ZHANG, Kai; GUO, Xin. Single-Molecule Mechanism of pH Sensitive Smart Polymer. **Acta Chimica Sinica**, [S.L.], v. 79, n. 4, p. 500, 2021. Shanghai Institute of Organic Chemistry. <http://dx.doi.org/10.6023/a20110529>. Disponível em: http://sioc-journal.cn/Jwk_hxxb/EN/10.6023/A20110529. Acesso em: 23 fev. 2024.

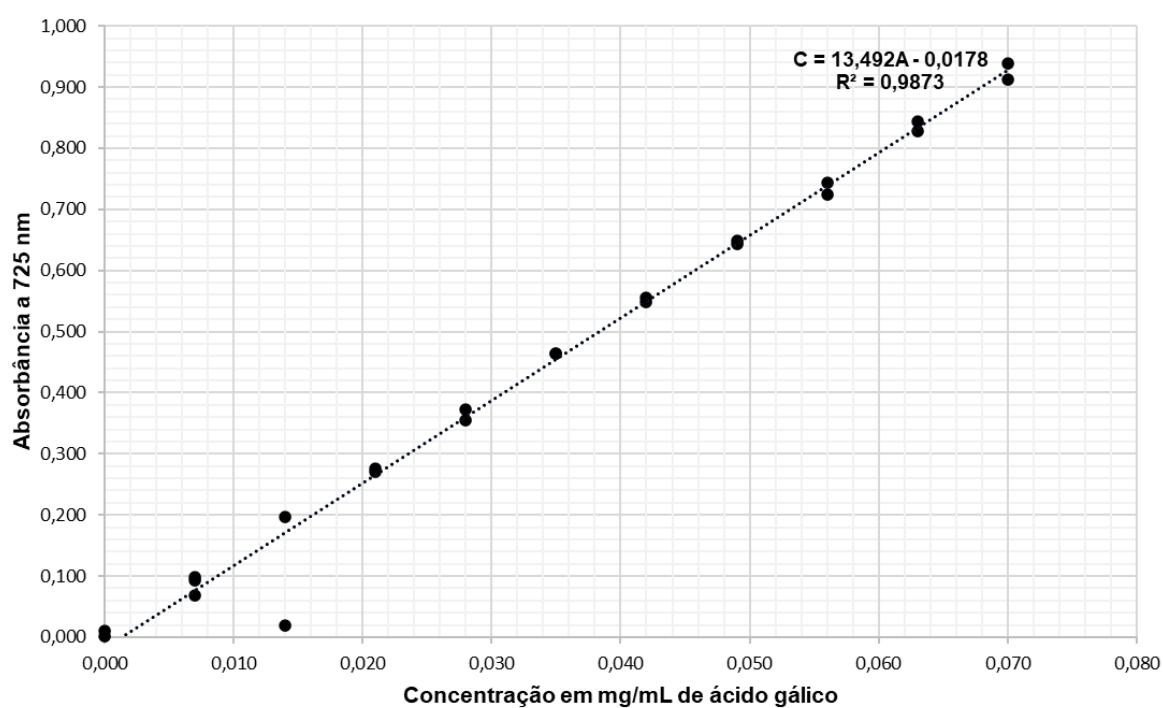
ZHANG, Yangyang; CHEN, Mingchen; LU, Jiajun; LI, Wenfei; WOLYNES, Peter G.;

WANG, Wei. Frustration and the Kinetic Repartitioning Mechanism of Substrate Inhibition in Enzyme Catalysis. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [S.L.], v. 126, n. 36, p. 6792-6801, 31 ago. 2022. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c03832>. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jpcb.2c03832>. Acesso em: 26 dez. 2023.

APÊNDICE

A curva de calibração gerada foi $C = 13,492A - 0,0178$. O coeficiente de correlação linear foi $R^2 = 0,9873$. C corresponde à concentração de ácido gálico expresso em mg/mL, A corresponde a absorbância medida no comprimento de onda de 725 nm, Figura 27.

Figura 27 - Gráfico da curva de calibração do ácido gálico expresso em mg/mL



Fonte: Elaborado pela autora